Chemische Untersuchungen zur Struktur der Zellwandpolymere von Methanosarcina barkeri

Peter Kreisl

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0024

Chemische Untersuchungen zur Struktur der Zellwandpolymere von Methanosarcina barkeri

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Peter Kreisl
aus
Roding/Oberpfalz

Februar 1984

1. Berichterstatter : Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung : 18.4.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	3
1.	Organismen	3
2.	Nährmedien und Anzucht	3
3.	Gewinnung der Zellwände	3
4.	Herstellung wasserlöslicher Zellwandpräparationen	4
5.	Behandlung der Zellwände mit HF	4
6.	Enzymatische Behandlung der Zellwand-Polymere	5
6.1.	Behandlung mit Chondroitinasen	5
6.2.	Behandlung mit Hyaluronidase	5
7.	Hydrolysebedingungen	6
7.1.	Totalhydrolysen	6
7.1.1.	Aminosäuren und Aminozucker	6
7.1.2.	Neutralzucker	6
7.1.3.	Acetat	6
7.1.4.	Uronsäuren	6
8.	Partialhydrolysen	7
9.	Chromatographische Verfahren	7
9.1.	Papierchromatographie	7
9.2.	Dünnschichtchromatographie	8
9.3.	Papierelektrophorese	8
9.4.	Der Aminosäure-Analysator	9
9.5.	Gaschromatographie	9
9.5.1.	Uronsäuren und Aldosen nebeneinander	9
9.5.2.	Aminozucker und Aldosen nebeneinander	11
9.5.3.	Analyse der Smith-Abbauprodukte carboxylreduzierter Zellwände	12

9.5.3.1.	Bestimmung des Glycolaldehyds	12
9.5.4.	Analyse der Smith-Abbauprodukte nativer Zellwände	13
9.5.5.	Organische Säuren	13
9.5.6.	Quantitative Auswertung	13
9.5.7.	Apparative Bedingungen	14
10.	Sprühreagentien	16
10.1.	Ninhydrin für Aminoverbindungen	16
10.2.	Alkalisches Silbernitrat für Zucker	16
10.3.	Anilinphthalat für Zucker	16
10.4.	Chlor/KJ für N-Acetylgruppen	16
10.5.	Hydroxylamin/Fe^{3+} für Uronsäure-lactone	17
11.	Vergleichssubstanzen	17
12.	Qualitative und quantitative Bestimmungsmethoden (ohne Gaschromatographie)	18
12.1.	Aminozucker	18
12.1.1.	MBTH-Methode	18
12.1.2.	Elson-Morgan-Test	18
12.1.3.	Morgan-Elson-Test	19
12.1.4.	D-Galactosamin	19
12.2.	Neutralzucker	20
12.2.1.	D-Glucose und D-Mannose	20
12.2.2.	D-Galactose	20
12.3.	Uronsäuren	21
12.3.1.	m-Phenylphenol Methode	21
12.3.2.	Carbazol Methode	21
12.4.	Gesamtzucker	22
12.5.	Acetat	22
12.6.	Estergebundene Acylgruppen	23
12.6.1.	Bestimmung mit Hydroxylamin	23
12.6.2.	Bestimmung durch Ammonolyse	23
12.7.	Glycerin	23

12.8.	Sulfat	24
12.9.	Phosphat	24
12.10.	Reduzierende Gruppen	25
12.11.	Aschegehalt	25
13.	Reduktion der Carbodiimid aktivierten Uronsäuren im Zellwand-Polymer	26
14.	Hydrazinolyse	26
15.	N-Acetylierung der Aminozucker	27
16.	Behandlung der Zellwände mit Perjodsäure	27
16.1.	Allgemeine Bedingungen	27
16.2.	Smith-Abbau	28
17.	Spezifische Zerlegung des Zellwand-Polymers	28
18.	Darstellung der Erythronsäure aus Erythrose	29
C.	Ergebnisse	31
I.	Morphologie der Zellwand-Polymere von Methanosarcina barkeri	31
II.	Chemische Zusammensetzung der Zellwände von Methanosarcina barkeri	34
1.	C/N-Verhältnisse isolierter Zellwand-sacculi	34
2.	Proteinanteil der Zellwände	35
3.	Kohlenhydrat-Zusammensetzung der Zellwand von Methanosarcina	35
3.1.	Neutralzucker	38
3.2.	Uronsäuren	38
3.2.1.	Identifizierung der Uronsäuren	38
3.2.2.	Quantitative Bestimmung der Uronsäuren	44
3.2.3.	Reduktion der Uronosyl-Carboxylfunktion im Zellwand-Polymer	44
3.2.4.	Chemische Zusammensetzung carboxylreduzierter Zellwände	45
3.2.5.	Konfigurationsbestimmung der Uronsäuren	48

3.3.	Aminozucker	49
3.3.1.	Identifizierung der Aminozucker	49
3.3.2.	Quantitative Bestimmung des Galactosamins	49
3.3.3.	Konfigurationsbestimmung des Galactosamins	52
4.	Anorganische Bestandteile von Methanosarcina Zellwand-Präparationen	52
5.	Chemische Zusammensetzung wasserlöslicher Zellwand-Präparationen	54
6.	Versuche zur enzymatischen Spaltung der Zellwand-Polymere	54
III.	Versuche zur Strukturaufklärung	56
1.	Smith-Abbau unbehandelter Zellwände	56
2.	Smith-Abbau carboxylreduzierter Zellwände	56
3.	Isolierung und Analyse charakteristischer Bruchstücke der Methanosarcina Zellwand	59
4.	Isolierung und Analyse der chemisch modifizierten "repeating unit" des Zellwand-Polymers von Methanosarcina	66
D.	Diskussion	67
1.	Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand von Methanosarcina barkeri	67
2.	Zur Struktur der Zellwand-Polymere von Methanosarcina barkeri	68
3.	Schlußbetrachtung	71
E.	Zusammenfassung	74
F.	Literaturverzeichnis	76

Verwendete Abkürzungen :

ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Rinderserum Albumin
Gal	Galactose
GalN	Galactosamin
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GalUA	Galacturonsäure
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcUA	Glucuronsäure
Man	Mannose
ManUA	Mannuronsäure
NAD	β-Nikotinamid Adenin Dinucleotid
NADP	β-Nikotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
RT	Raumtemperatur
UA	Uronsäure
ZW	Zellwand

A. EINLEITUNG

Die Gruppe der Methanbakterien unterscheidet sich von allen anderen bekannten Prokaryonten durch die Methanbildung als Energiequelle für autotrophes Leben. Methanogene Bakterien sind in der Natur weit verbreitet. Sie besiedeln strikt anaerobe ökologische Nischen wie: aquatische Sedimente (Sümpfe, Marschen, Seen, Ozeane); den Pansen von Rindern; die Faultürme kommunaler Kläranlagen oder auch Thermalquellen. Aufgrund vergleichender Untersuchungen der 16S rRNS Oligonucleotidsequenzen, Zusammensetzung der Zellhüllen und Lipidstrukturen wird die Gruppe der Methanbakterien zusammen mit den Halobakterien, Sulfolobus und Thermoplasma als eigener phylogenetischer Zweig (Archaebakterien) betrachtet. (Balch et al.,1979; Fox et al.,1977; Woese & Fox,1977; Woese et al.,1978).
Man nimmt an, daß im Verlauf der Evolution die Abspaltung der Archaebakterien von den übrigen Prokaryonten und Urkaryonten schon sehr früh stattgefunden hat (Woese & Fox, 1977; Woese et al.,1978). Wie bereits erwähnt, kann die Zusammensetzung der Zellhüllen zur Klassifizierung der Prokaryonten herangezogen werden (Schleifer & Kandler,1972; Kandler,1979,1981,1982). Charakteristisch für alle bisher untersuchten Methanbakterien ist das Fehlen von Murein, dem typischen Zellwandpolymer aller " klassischen " Bakterien. Die aufgefundenen Bauprinzipien der Zellhüllen methanogener Bakterien variieren sehr stark. Viele der gramnegativen Methanbakterien wie Methanococcus, Methanogenium und Methanomicrobium besitzen keine Zellwand im strengen Sinn, sondern weisen Zellhüllen aus Glycoproteinen, bzw. Strukturproteine im Fall Methanospirillum und Methanothrix auf. Nur bei 4 Gattungen konnten mechanisch stabile Zellwandsacculi isoliert werden. Methanobakterium, Methanobrevibakter und

Methanothermus besitzen Zellwandpolymere, die als Pseudomurein bezeichnet werden (Kandler & König,1978; König & Kandler,1979a,1979b,1980; König et al.,1982). und an Murein erinnern. Dagegen weist Methanosarcina barkeri Zellwandsacculi auf, die sich aus Heteropolysacchariden mit Uronsäuren und Galactosamin als Hauptkomponenten zusammensetzen (Kandler & Hippe,1977).
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zusammensetzung und Struktur der Zellwand-Polysaccharide von Methanosarcina barkeri aufzuklären.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Die Stämme DSM 800, (Typstamm); 1855; 2053; 1253; 804 und Bryant G1 wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen (Dr. Hippe) bezogen. Gefriergetrocknete Zellen des "methanogenen Konsortiums HMR-3, Anzucht Instinok" wurden von Herrn S. Schoberth (Jülich) zur Verfügung gestellt.

2. Nährmedien und Anzucht

Die Organismen wurden in einem MS-Medium (Ferry et al., 1974) angezogen, das folgendermaßen modifiziert wurde (nach Hammes et al., 1979):
K_2HPO_4, 0.255g/l; KH_2PO_4, 0.255g/l; $(NH_4)_2SO_4$, 0.255g/l; NaCl, 0.50g/l; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.10g/l; $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.07g/l; Hefeextrakt, 2.0g/l; Trypticase, 2.0g/l; Natriumacetat, 5g/l; 0.2% $FeSO_4 \times 7H_2O$, 1ml; 0.1% Resazurin, 1ml; Vitaminlösung (Wolin et al., 1963), 10ml; Mineralsalz-lösung, (Wolin, et al., 1963), 10ml; $NaHCO_3$, 6g/l; 50ml Reduktionsmittel-lösung, die 2g NaOH, 0.62g Cystein-hydrochlorid und 0.629g $Na_2S \times 9H_2O$ enthielt.
Für die Massenanzucht in einem 75 Liter Fermenter (Braun Melsungen) wurde dem autoklavierten Medium Methanol zugesetzt (0.5% Endkonzentration im Nährmedium). Nach Einstellen des pH-Werts auf 6,8 mit steriler Essigsäure, wurde angeimpft und bei 37° 7 bis 10 Tage inkubiert. (DSM 1855, Zinder und Mah bei 50°).

3. Gewinnung der Zellwände (nach Schleifer & Kandler, 1967)

Die lyophilisierten Zellen wurden im Homogenisator (Bühler, Tübingen) mit Glasperlen von 0.17-0.18mm Durchmesser (Braun Apparatebau, Melsungen) in etwa 90 Minuten zerschlagen.

Die Überprüfung erfolgte im Phasenkontrastmikroskop. Das Zellhomogenisat wurde mit einer Schott-G-1-Fritte von den Glasperlen abgetrennt. Anschließend wurde das Filtrat 20 Minuten bei 20 000 U/min. zentrifugiert (Sorvall Kühlzentrifuge, SS-34-Rotor), das Sediment in 0,05 mol Phosphatpuffer pH 7,8 mit dem Ultraturax (IKA-Werk, Staufen) suspendiert und kurz aufgekocht.
Die Suspension wurde mit 0,5 mg Trypsin/ml (Merck) versetzt, mit Toluol überschichtet, über Nacht bei 37° inkubiert, dann zentrifugiert und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach anschließender Gefriertrocknung wurde das restliche Wasser im Trockenschrank bei 105° entfernt. Die so erhaltenen Zellwände wurden im Exsiccator über $CaCl_2$ aufbewahrt.

4. Herstellung wasserlöslicher ZW-Präparationen

Wasserunlösliche ZW wurde in einer wässrigen Lösung von $NaBH_4$ (10%) für 12 h bei 60° inkubiert. Danach das überschüssige $NaBH_4$ durch Zugabe von Eisessig zersetzt und die so erhaltene, leicht rosafarbene Lösung 3 Tage gegen Leitungswasser dialysiert. Hierbei fällt ein Teil der ZW wieder aus. Nach Gefriertrocknung des gesamten Inhalts des Dialyseschlauchs wurde mit 2N HCl bei 98° 2 bis 3 Minuten hydrolysiert, dann sofort mit $NaHCO_3$ neutralisiert und abermals 3 Tage gegen H_2O (dest.) dialysiert. Nach Gefriertrocknung wurden 50 bis 60% der eingesetzten Zellwand als wasserlösliches Derivat erhalten.

5. Behandlung der ZW mit 70%-iger HF Lösung in Wasser (nach König, 1979)

10 mg ZW wurden unter Eiskühlung mit 2ml 70%-iger HF für 3 h in Polyethylen-Zentrifugenbechern inkubiert. Anschließend wurde die Säure im Ölpumpenvakuum über NaOH Rotuli abgezogen und der Rückstand mit 0.1N LiOH neutralisiert.

6. Enzymatische Behandlung der ZW-Polymere

6.1. Behandlung mit Chondroitinase (nach Yamagata et al., 1968)

Inkubationsansatz:
Die Substratmenge (Zellwände bzw. wasserlösliche Zellwandpräparationen) wurde so bemessen, daß etwa 10 µmol an Glucuronsäure vorlagen. a) Chondroitinase ABC (aus Proteus vulgaris): 5 ml eines 0.005M Natriumacetat-Puffers pH 6.2; 0.3 mmol Natriumacetat; 0.5 mg BSA und eine Aktivitätseinheit Enzym. b) Chondroitinase AC (aus Proteus vulgaris): 5 ml eines 0.005M Kaliumacetat-Puffers pH 5.0; 0.3 mmol Natriumacetat; 0.5 mg BSA und eine Aktivitätseinheit Enzym. Die Inkubation erfolgte für 24h bei 37°. Nach beendeter Inkubation wurde mit einigen Tropfen Eisessig angesäuert und 5 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Die Überstände sodann bei RT abgeblasen, über eine kurze Säule (Dowex H^+) entsalzt und nochmals abgeblasen. Die erhaltenen Rückstände wurden mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

6.2. Behandlung mit Hyaluronidase (nach Steber, 1976)

Das Inkubationsgemisch hatte folgende Zusammensetzung:
0.7 ml eines 0.3M Natriumphosphat-Puffers pH 5.3; 0.5 ml BSA (5mg/ml); 0.2 ml ZW-Lösung (4mg/ml); 0.05 ml Enzymlösung (das lyophilisiert vorliegende Enzym wurde in einer Konzentration von 10mg/ml in folgendem Puffer gelöst: 0.02M Phosphat-Puffer pH 6.9; 4.5 mg NaCl/ml; 0.1mg BSA/ml. Die Inkubation erfolgte für 24h bei 37°; danach wurde 30 Min. bei 90° erhitzt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Abblasen bei RT eingeengt und papierelektrophoretisch auf Oligomere hin untersucht.

7. Hydrolysebedingungen

7.1. Totalhydrolysen

7.1.1. Aminosäuren und Aminozucker (nach Schleifer & Kandler, 1967)

Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren und Aminozucker mit dem Aminosäureanalysator wurden Zellwände in zugeschmolzenen Fiolaxröhrchen mit 4N HCl (0.1 ml/mg) bei 100° für 16h hydrolysiert.

7.1.2. Neutralzucker

Zum Nachweis der Neutralzucker wurden die Zellwände mit 2N HCl, 2h bei 100° hydrolysiert. Diese Bedingung wurde durch Hydrolysekinetik ermittelt.

7.1.3. Acetat (nach Fromme & Beilharz, 1978)

Zur Bestimmung des Gesamtacetats wurde mit 0.2N HCl 12h bei 100° hydrolysiert. Nach Einstellen des pH-Wertes mit NaOH auf 3 bis 4 wurde die wässrige Lösung direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

7.1.4. Uronsäuren (nach Jeffrey & Rienits, 1967)

Zur präparativen Gewinnung der Uronsäuremonomeren wurden 10 mg ZW mit 0.1g Dowex H^+ in 1.0 ml 0.05N HCl für 24h unter gelegentlichem Umschütteln bei 100° hydrolysiert. Danach wurde das Hydrolysat auf eine Dowex H^+ Säule (1x3 cm) aufgetragen, der Vorlauf nochmals über die Säule geschickt und anschließend mit 20 ml Wasser gewaschen. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne evaporiert. (Diese Fraktion enthält Uronsäuren und Neutralzucker. Die Trennung und Analyse dieser Komponenten ist im Abschnitt über gaschromatographische Methoden beschrieben).

8. Partialhydrolysen

Um eine optimale Ausbeute an charakteristischen Zellwandfragmenten zu erhalten wurden Hydrolysekinetiken mit 6N, 4N, und 2N HCl erstellt. Als beste Hydrolysebedingung erwies sich 2N HCl von 2 bis max. 8h bei 100°.

9. Chromatographische Verfahren

9.1. Papierchromatographie

Verwendete Papiere: Whatman 1; Whatman 3; und Schleicher Schüll 2043.

Lösungsmittelgemische:
(Die angegebenen Zahlenwerte geben die Volumenverhältnisse wieder)

A Isopropanol/Eisessig/Wasser = 75/15/10
B α-Picolin/Ammoniak/Wasser = 70/2/28
C Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser = 60/40/3/30
D Pyridin/Ethylacetat/Eisessig/Wasser = 5/5/1/3

Verwendung

Lösungsmittel A und B wurden zur zweidimensionalen Auftrennung der Aminozucker und Aminosäuren in Totalhydrolysaten eingesetzt. A und C wurden zur zweidimensionalen Trennung der Hexosen (Neutralzucker, Uronsäuren, Uronsäurelactone und Aminozucker) verwendet.
Lösungsmittel D diente zur präparativen, papierchromatographischen Auftrennung der monomeren und oligomeren Zellwandzucker in Partialhydrolysaten.

9.2. Dünnschichtchromatographie

Verwendete Dünnschichtplatten:

Kieselgel G 60, 0.25 mm Schichtdicke (Merck)
Cellulose, 0.1 mm Schichtdicke (Macherey-Nagel)

Lösungsmittelgemische:

a) Cellulose
Die Lösungsmittel für die Papierchromatographie wurden auch für die Dünnschichtchromatographie auf Cellulose verwendet.
b) Kieselgel
n-Propanol/Ammoniak/Wasser = 60/30/10

Verwendung:

Die Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten diente zu analytischen Zwecken bei Vorliegen geringer Substanzmrngen.
Mit dem für Kieselgelplatten angegebenen Lösungsmittel wurden Aminozucker enthaltende Smith-Abbauprodukte präparativ aufgereinigt.

9.3. Papierelektrophorese

Die Papierelektrophorese wurde bei 2.7 kV (5^{o}) durchgeführt. Im Puffersystem Pyridin/Eisessig/Wasser = 10/4/86 pH 5.3 konnten dadurch Reste an Uronsäurekontaminationen in isolierten Aldobiuronsäuren abgetrennt werden.

9.4. Der Aminosäureanalysator

Gerät: Beckman 120 C
Puffer: 0.2M Citratpuffer pH 3.25
0.7M Citratpuffer pH 4.35
Pufferwechsel nach 100 Minuten.
Temperaturprogramm: 10 Minuten bei 30°, dann bis 55° in 45 Minuten.
Harz: M 72 oder M 82 (Beckman)

9.5. Gaschromatographie

9.5.1. Uronsäuren und Aldosen nebeneinander (nach Jones & Albersheim,1972; Perry & Hulyalkar, 1965)

Die Identifizierung der Uronsäuren erfolgte an der, Neutralzucker und Zuckersäuren enthaltenden Fraktion von Zellwandhydrolysaten nach Ionenaustauschchromatographie (siehe unter 7.1.4.).

Delactonisierung

Die zur Trockne eingeengten Fraktionen wurden in 1.0 ml 1N NH_4OH aufgenommen und dann bei 45 bis 50° abgeblasen.

Reduktion

Der nach Abblasen erhaltene Rückstand wurde in 1.0 ml 1N NH_4OH, der 6 mg Natriumborhydrid enthielt gelöst und eine Stunde bei RT stehengelassen. Danach das überschüssige $NaBH_4$ mit Eisessig zerstört, 1 ml Methanol zugegeben und bei 40° abgeblasen. Die Probe wurde insgesamt 5 mal mit 1 ml 10%-iger Essigsäure/Methanol (w/v) aufgenommen und abgeblasen (Entfernung der entstandenen Borsäure als flüchtiger Borsäuretrimethylester).

Isolierung der gebildeten Aldonsäuren und Alditole

Der trockene Rückstand nach der letzten Methanol/Eisessig Evaporation wurde in 3 ml Wasser aufgenommen und in einen Erlenmeyerkolben transferiert, der etwa 0.3g Dowex 1 (Acetatform) enthielt. Diese Suspension wurde mit einem Magnetrührer eine Stunde bei RT gerührt. Danach wurde das Harz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit 5 ml Wasser gewaschen. Überstand und Waschwasser wurden vereinigt.

Diese Fraktion enthält die, aus den Aldosen entstandenen Alditole.

Die Aldonsäuren, die durch Reduktion der Uronsäuren gebildet wurden, konnten durch Rühren des Anionenaustauschers in 2 ml 1N HCl für 30 Minuten bei RT wieder eluiert werden. Das Harz wurde dann durch Filtration über Glasfiberpapier abgetrennt, und das Filtrat zur Lactonisierung der Aldonsäuren bei 40° abgeblasen.

Reduktion der Aldonolactone

Die getrockneten Proben wurden in einigen Tropfen eines 10 mM Boratpuffers pH 7.5 gelöst und dann 10 mg $NaBH_4$ in 0.5 ml des gleichen Puffers zugegeben. Nach einer Stunde stehenlassen bei RT im Dunkeln wurde zur Aufarbeitung wie oben beschrieben verfahren.

Diese Fraktion enthält die, aus den Uronsäuren gebildeten Alditole.

Acetylierung der Alditole

Zur Acetylierung wurden die trockenen Proben mit 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Essigsäureanhydrid gemischt, 15 Min. bei 100° erhitzt, mit einem Vortex Mixer gemischt und nochmals 15 Min. bei 100° erhitzt. Nach Abkühlen der Proben wurden 1 bis 5 μl der Acetylierungsmischung in den Gaschromatographen eingespritzt.

Silylierung der Aldonolactone

Die isolierten Aldonolactone wurden in 0.5 ml Pyridin gelöst. Sodann erfolgte Zugabe von 0.1 ml Hexamethyldisilazan und 0.1 ml Trimethylchlorsilan. Die Proben wurden dann 15 Minuten bei RT geschüttelt. Die Analyse der TMS-Derivate erfolgte gaschromatographisch ohne weitere Aufreinigung.

9.5.2. Gaschromatographischer Nachweis der Neutral,- und Aminozucker nebeneinander (nach Porter, 1975)

Hydrolyse

5 mg carboxylreduziertes ZW-Polymer wurden mit 5 ml H_2O und 5 ml einer 40%-igen (w/v) Suspension von Dowex 50-X2 (H^+-Form, 200 bis 400 mesh) in 0.02N HCl gemischt und für 48h bei 100° hydrolysiert.

Desaminierung

Nach beendeter Hydrolyse wurde 1 ml einer frisch angesetzten 5.5M $NaNO_2$-Lösung zugegeben. Diese Mischung wurde unter gelegentlichem Schütteln 30 Min. bei RT stehengelassen.

Entsalzen und Neutralisieren

Nach beendeter Desaminierung wurden 10 ml einer 40%-igen (w/v) Suspension von Dowex 50-X2 (H^+-Form) in H_2O zugegeben (Entfernung der Na^+ Ionen, sowie Überführung des überschüssigen $NaNO_2$ in HNO_2).

Die Entwicklung Nitroser Gase (NO, NO_2 und N_2O_4) kommt nach etwa 1h zum Stillstand (Abzug).

Der Ansatz wurde dann auf eine Kationenaustauscher-Säule (8g Dowex 50-X2 H^+-Form) aufgetragen. Das Eluat dieser Säule tropfte dann direkt auf einen Anionenaustauscher (10g Dowex 1-X8, Hydrogencarbonat-Form).

Das Hydrolysegefäß wurde dreimal mit 20 ml H_2O gespült und das Waschwasser auf die Säule aufgetragen. Danach erfolgte Elution mit 80 ml 50% (v/v) Methanol/Wasser. Die vereinigten Eluate wurden in einem Rundkolben gesammelt und bei 40° am Rotationsverdampfer auf etwa 1 ml eingeengt.

Reduktion und Acetylierung

Die Probe wurde aus dem Rundkolben in ein Reagenzglas überführt und das Volumen mit H_2O auf 5 ml eingestellt. Zu dieser Lösung wurden dann 5 ml einer 0.22M $NaBH_4$-Lsg. zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde das überschüssige $NaBH_4$ durch Zugabe von 2 ml Eisessig zersetzt und die Lsg. bei RT abgeblasen. Die entstandene Borsäure wurde als flüchtiger Trimethylester durch Zugabe von 4 mal 10 ml Portionen Methanol/HCl (1000 : 1) und Abblasen nach jeder Zugabe entfernt. Zur Acetylierung wurden dann 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Essigsäureanhydrid zugegeben, 15 Min. lang auf 100° erhitzt (Sandbad); danach mit einem Vortex Mixer gemischt, und nochmals 15 Min. bei 100° derivatisiert. Nach Abkühlung wurden 1 bis 5 ul der Acetylierungsmischung in den Gaschromatographen eingespritzt.

9.5.3. Analyse der Smith-Abbauprodukte carboxylreduzierter Zellwände

Polyole und Galactosamin wurden nach der, unter 9.5.2. beschriebenen Methode bestimmt. Bei quant. Untersuchungen wurde nach der Hydrolyse 1 mg myo-Inosit als interner Standard zugegeben.

9.5.3.1. Bestimmung des Glycolaldehyds (nach Yamaguchi & Mukumoto, 1977)

Zur quantitativen Bestimmung des Glycolaldehyds wurden 5 mg carboxylreduzierte ZW nach Smith-Abbau mit 1 ml 0.175N HCl der 25 mg Hydroxylamin/HCl enthielt, 90 Min. bei 80° hydrolysiert.Danach wurde abgeblasen, der Rückstand in Methanol aufgenommen und wieder abgeblasen (3 mal). Zur Silylierung wurde die Probe in 0.5 ml Pyridin aufgenommen und 0.25 ml Hexamethyldisilazan sowie 0.15 ml Trimethylchlorsilan zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde zentrifugiert und vom Überstand 1 bis 5 ul in den Gaschromatographen eingespritzt.

9.5.4. Analyse der Smith-Abbauprodukte nativer Zellwände

Nach Behandlung mit Perjodsäure und Reduktion mit $NaBH_4$ (siehe Smith-Abbau) wurde 3h mit 2N HCl bei 100° hydrolysiert. Nach Abblasen wurde der Rückstand in Ethanol (98%) aufgenommen, abzentrifugiert und der Überstand abgeblasen. Die Probe wurde dann silyliert (0.5 ml Pyridin, 0.5 ml Hexamethyldisilazan, 0.3 ml Trimethylchlorsilan). 1 bis 5 ul der Derivatisierungsmischung konnten dann ohne weitere Aufreinigung in den Gaschromatographen eingespritzt werden.

9.5.5. Organische Säuren

Zum Nachweis organischer Säuren (C_2 bis C_5) wurden saure Hydrolysate unbehandelt in den Gaschromatographen eingespritzt.

9.5.6. Quantitative Auswertung

Die quantitative gaschromatographische Bestimmung der Neutral,- und Aminozucker, sowie der Smith-Abbauprodukte erfolgte nach der Methode von Lenhardt und Winzler (1968). Für eine zu bestimmende Substanz x gilt:

$$\mu\text{mol}x/\text{mg} = \frac{(\text{Pf von } x)\ (\mu\text{mol Standard})}{(\text{Pf Standard})\ (\text{Rf})\ (\text{mg Zellwand})}$$

Pf: = Peakfläche
Rf: = relativer, molarer Responsfaktor

Für die, nach der Methode von Porter (s. 9.5.2.) vorgenommenen Bestimmungen wurden folgende Responsfaktoren gefunden:

Kohlenhydrat [a]	rel. molarer Rf
Glucose	0.90
Galactose	0.81
Galactosamin	0.383
Erythrit	0.386
Threit	0.387
myo-Inosit	1.00

a) Bezeichnung der Kohlenhydrate vor der Derivatisierungsprozedur (9.5.2.)

Die quantitative gaschromatographische Bestimmung der organischen Säuren erfolgte mittels einer, an den Gaschromatographen angeschlossenen Integrators.

9.5.7. Apparative Bedingungen

a) Derivatisierte Verbindungen

Es wurde ein Hewlett Packard Research Gaschromatograph Model 7620 A verwendet.

Acetylierte Verbindungen

Temperatur:

Injektorblock:	250°
FID:	300°
Säulentemp.:	160° 2 Min. isotherm, dann 8° pro Min. bis 260°

Trägergas:

N_2 (30 ml/Min.)

Brenngas:

H_2 (40 ml/Min.); Pressluft (400 ml/Min.)

Säule: Glassäule, 1.82 m, Ø 1/8 Zoll, 3% Sp 2340 auf 100/120 Supelcoport.

Silylierte Verbindungen

Temperatur:

Injektorblock: 250°
FID: 300°
Säulentemp.: 110° 2 Min. isotherm, dann 8° pro Min. bis 250°

Trägergas:

N_2 (30 ml/Min.)

Brenngas:

H_2 (40 ml/Min.); Pressluft (400 ml/Min.)

Säule: 1.82 m, Ø 1/8 Zoll, 1% SE 30 auf 100/120 Gas Chrom Q.

b) Organische Säuren

Es wurde ein Packard GC 433 verwendet.

Temperatur:
Injektorblock: 225°
FID: 225°
Säulentemp.: 195° isotherm
Trägergas:
N_2 (25 ml/ Min.)
Säule: 1.8 m Edelstahl Ø 1/8 Zoll, Chromosorb 101, 80/100.

10. Sprühreagentien

10.1. Ninhydrin für Aminoverbindungen

920 ml wassergesättigtes Butanol
70 ml Eisessig
5 g Ninhydrin
Entwickelt wurde für 10 Minuten bei 100°

10.2. Alkalisches Silbernitrat für Zucker (nach Trevelyan et al., 1950)

Lösung A: 5 ml gesättigte $AgNO_3$-Lsg. auf 1000 ml Aceton. Es wurde gerade soviel Wasser zugegeben, bis der Silbernitratniederschlag vollständig gelöst war.
Lösung B: 10 ml gesättigte NaOH-Lsg. in 400 ml Ethanol.
Lösung C: 10%-ige Thiosulfatlösung.
Zuerst wurde mit Lsg. A, dann mit Lsg. B gesprüht. Fixiert wurde in Lsg. C.

10.3. Anilinphthalat für Zucker (nach Partridge, 1949)

0.91 ml Anilin
1.66 g Phthalsäure
100 ml wassergesättigtes Butanol
Neutralzucker wurden 5 bis 10 Minuten bei 100° entwickelt. Aminozucker konnten durch ihre Fluoreszenz im UV sichtbar, oder durch kurzes Erhitzen der Chromatogramme auf 200° nachgewiesen werden.

10.4. Chlor/KJ-Reagenz für N-Acetyl-gruppen (nach Rydan & Smith, 1952)

Die Chromatogramme wurden 10 Min. Chlorgas ausgesetzt, anschließend 30 Min. gelüftet und danach mit einer wässrigen Lsg. aus 1% Stärke und 1% KJ besprüht.

10.5. Hydroxylamin/Fe^{3+}-Reagenz für Uronsäurelactone (nach Clotten & Clotten, 1962)

Lösung A: 7g Hydroxylamin/HCl in 100 ml Methanol lösen und mit einer 7.2%-igen KOH-Lösung in Methanol mischen. Vom ausgefallenen KCl abfiltrieren.

Lösung B: 1g $FeCl_3$ in 100 ml 1% HCl lösen.

Mit Lösung A besprühen und 15 Minuten an der Luft trocknen. Dann mit Lösung B sprühen.

11. Vergleichssubstanzen

Aminosäuren:	Standardgemisch für den Aminosäure-analysator (Sigma)
Aminozucker:	D-GalN, D-GlcN, D-ManN, D-GalNAc, D-GlcNAc (Sigma)
Neutralzucker:	D-Glc, D-Gal, D-Man, D-Tal, D-Gul, D-Alt, D-Id, D-All, (Sigma) Ara, Rib, (Serva) Xyl, (Fluka) Lyx, Erythrose (Sigma)
Polyole:	Erythrit, Threit, myo-Inosit, (Sigma)
Uronsäuren:	D-GlcUA, D-GalUA, D-ManUA, (Sigma)
Aldonsäuren:	D-Gluconsäure, D-Gulonsäure, D-Galactonsäure (Sigma) Glycerinsäure (Sigma), Erythronsäure, (Eigensynthese aus Erythrose)

12. Qualitative und quantitative Bestimmungsmethoden (ohne Gaschromatographie)

12.1. Aminozucker

12.1.1. MBTH-Methode (nach Smith & Gilkerson, 1979)

Reagenzien: a) 0.5M HCl; b) 2.5% Natriumnitrit; c) 12.5% Ammonium-sulfamat; d) 0.25% MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolon-hydrazon-hydrochlorid) e) 0.5% Eisen(III)-chlorid, (0.83g $FeCl_3$ x 6 H_2O/100 ml Wasser)

Durchführung:
0.01 bis 0.04 µmol N-Acetyl-aminozucker wurden in 200 µl 0.5M HCl bei 110° für 2h hydrolysiert. Nach Abkühlen auf RT wurden 400 µl 2.5% $NaNO_2$-Lsg. zugegeben (Abzug!), und 15 Min. stehengelassen. Das überschüssige $NaNO_2$ wurde sodann durch Zugabe von 200 µl 12.5% Ammonium-sulfamat-Lsg. zersetzt (5 Min. stehenlassen). Danach erfolgte Zugabe von 200 µl 0.25% MBTH-Lsg., und Inkubation der Proben bei 37° für 30 Min.. Nach beendeter Inkubation wurden 200 µl der $FeCl_3$-Lsg. zugegeben und nochmals 5 Min. bei 37° inkubiert. Bestimmung der Extinktion bei 650 nm. Auswertung erfolgte durch Eichkurven.

12.1.2. Elson-Morgan-Test (nach Boas,1953; Johnson,1971)

Reagenzien: a) 4% Acetylaceton in 1.5M Na_2CO_3; b) 2.67% (w/v) p-Dimethylamino-benzaldehyd in einer Lösung von 96% Ethanol/HCl conz. = 1 : 1.

Durchführung:
0.01 bis 0.22 µmol Aminozucker wurden in 1.0 ml H_2O gelöst und mit 1.0 ml Lsg.a) versetzt. Dann wurde 30 Min. in kochendem Wasser erhitzt. Es wurde auf RT abgekühlt und nach 10 Min. 5 ml 96% Ethanol zugemischt. Anschließend wur-

de 1.0 ml der Lsg.b) zugegeben und nach 30 Min. die Extinktion der Probe bei 530 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte über eine Eichkurve.

12.1.3. Morgan-Elson-Test (nach Reissig et al., 1955)

Reagenzien: a) 0.1M Boratpuffer pH 9.2; b) 10.5g p-Dimethylamino-benzaldehyd in 87.5 ml Eisessig und 12.5 ml HCl conz. lösen. (vor Gebrauch 1 : 10 mit Eisessig verdünnen).

Durchführung:
0.01 bis 0.10 µmol N-Acetyl-aminozucker wurden in 0.5 ml H_2O gelöst. Nach Zugabe von 0.1 ml Lsg.a) wurde 3 Min. bei 100° erhitzt, dann schnell abgekühlt (Eiswasser). Darauf wurde den Proben 3 ml Lsg.b) zugesetzt und 20 Min. bei 37° inkubiert. Bestimmung der Extinktion bei 578 nm. Auswertung über Eichkurve.

12.1.4. D-Galactosamin (nach Avigad et al., 1962)

Reagenzien: a) 0.1M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.0;
b) 0.5% o-Tolidin in Methanol
c) Peroxidase-Lsg., 100 AE pro ml; unmittelbar vor Gebrauch auf 5 AE pro ml verdünnen.
d) Chromogenlsg. 12.0 ml Lsg.a) werden mit 0.1 ml Lsg.b) gemischt.
e) D-Galactose Oxidase (EC 1.1.3.9.) Typ V, (Sigma), 1 AE pro ml H_2O.

Testansatz:
1.7 ml der Lsg.d) wurden mit 1.5 ml Probe und 0.1 ml Lsg.c) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.1 ml Galactose Oxidase Lsg. gestartet, und die Änderung der Extinktion bei 425 nm gegen eine Referenzprobe, die an Stelle der Galactose Oxidase Lsg. 0.1 ml H_2O enthielt gemessen.

12.2. Neutralzucker (nach Bergmeyer, 1974)

12.2.1. D-Glucose und D-Mannose

Testansatz: 1.0 ml Puffer pH 7.6 (0.05M Triethanolamin-hydrochlorid, 0.007M $MgCl_2$, 0.0014M Mercaptoethanol).
0.05 ml ATP-Lsg. (10 mg/ml)
0.05 ml NADP-Lsg. (10 mg/ ml)
0.20 ml Probe. Bestimmung von E_1 bei 366 nm.
Zugabe von 0.01 ml HK/Glc-6P-DH (1mg/ml, Boehringer)
Bestimmung von E_2 nach etwa 10 Min.
Zugabe von 0.01 ml PGI (2 mg/ml) und 0.01 ml PMI (2 mg/ml)
E_3 wurde nach Ablauf der Rkt. abgelesen.

Auswertung: a) Glucosegehalt: = $E_2 - E_1$
b) Mannosegehalt: = $E_3 - E_2$

12.2.2. D-Galactose

Testansatz: 1.0 ml Puffer pH 8.6 (0.1M Tris/HCl, 0.01M EDTA, 0.0014M Mercaptoethanol).
0.05 ml NAD-Lsg. (12 mg/ml); 0.20 ml Probe.
E_1 bei 366 nm. Dann erfolgte Zugabe von 0.01 ml Gal-DH (1 mg/ml)
E_2 wurde nach Reaktionsablauf bestimmt.

Auswertung: Galactosegehalt: = $E_2 - E_1$

12.3. Uronsäuren

12.3.1. m-Phenylphenol-Methode (nach Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973)

Reagenzien: a) 0.0125M Natriumtetraborat in H_2SO_4 conz.
b) 0.15% m-Phenylphenol in 0.5% NaOH-Lsg.

Meßbereich: 0.003 bis 0.078 umol Uronsäure.

Durchführung:

Unhydrolysierte ZW wurden in 0.1 ml H_2O durch 30 minütige Ultraschallbehandlung suspendiert, und mit 1.2 ml der Lsg.a) gemischt. Danach wurde für 5 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen mit Eiswasser erfolgte Zugabe von 0.02 ml der Lsg.b). Nach mischen und stehenlassen für 10 Min. bei RT wurde die Extinktion der Probe bei 520 nm bestimmt. Auswertung über Eichkurve.

12.3.2. Carbazol-Methode (nach Galambos, 1967)

Reagenzien: a) 4M Ammonium-amidosulfonat;
b) 1M Boratpuffer pH 8.4 (H_3BO_3/KOH);
c) 0.2% Carbazol in Ethanol;

Meßbereich: 5 bis 50 ug Uronsäure

Durchführung:

0.8 ml Probe wurden mit je 0.1 ml der Lösungen a) und b) gemischt. Dann erfolgte die Zugabe von 5.0 ml H_2SO_4 conz. (Eiskühlung). Die Proben wurden anschließend 6.5 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt, in Eiswasser gekühlt und mit 0.2 ml der Lsg.c) vermischt. Nach weiterem Erhitzen für 10 Min. im kochenden Wasserbad wurde die Extinktion der Proben bei 525 nm bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mittels Eichkurven.

Anmerkung:

Während in der m-Phenylphenol-Methode GlcUA und GalUA dieselben molaren Extinktionen aufweisen, zeigt die Carbazol-Methode für GlcUA eine etwa 1.5 fach höhere Extinktion als für GalUA.

12.4. Gesamtzucker

Anthrontest

Reagenz: 20 mg Anthron in 100 ml 70% H_2SO_4

Meßbereich: 0.05 bis 3 µmol Glucoseäquivalente.

Durchführung:

Die Proben wurden in 0.4 ml H_2O gelöst und mit jeweils 4 ml Anthronreagenz versetzt. Dann wurde 8 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Extinktion bei 623 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte über eine Eichkurve.

12.5. Acetat (nach Bergmeyer, 1974)

Reagenzien:
a) Puffer: 0.2M Triethanolamin/HCl, 0.02M $MgCl_2$, pH 7.4;
b) 50 mg ATP in 1.0 ml $NaHCO_3$;
c) 4M Hydroxylamin/HCl (vor Gebrauch mit 4N NaOH neutralisieren);
d) 0.6M Trichloressigsäure;
e) 0.06M $FeCl_3$-Lsg.

Meßbereich: 0.25 bis 2 µmol Essigsäure.

Testansatz: 0.50 ml Lsg.a) 0.20 ml Lsg.b) 0.20 ml Lsg.c) 0.1 ml Probe, 0.02 ml Acetatkinase (5 mg/ml); 30 Min. bei 37° inkubieren, dann Zugabe von 1.0 ml Lsg.d) und 4.0 ml Lsg.e). Der Ansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und die Extinktion bei 546 nm gemessen.

Auswertung:

$$\mu\text{mol Acetat} = \frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{Extinktion des Standards}}$$

12.6. Estergebundene Acylgruppen

12.6.1. Bestimmung mit Hydroxylamin (nach Hestrin, 1949)

Die Messungen wurden an ZW-Suspensionen vorgenommen.

Reagenzien: a) 2M Hydroxylamin/HCl
b) 3.5M NaOH
c) 4N HCl
d) 0.37M $FeCl_3$ in 0.1N HCl

Meßbereich: 0.05 bis 1 µmol Acylester.

Durchführung:

Zu 1.0 ml Probe wurden 2.0 ml einer frischen 1 : 1 Mischung der Lösungen a) und b) pipettiert. Nach etwa einer Min. wurden je 1.0 ml der Lösungen c) und d) zugegeben, zentrifugiert und die Extinktion bei 546 nm bestimmt. Die Werte wurden gegen eine Parallelprobe korrigiert, zu der die Reagenzien in der Reihenfolge c), a)/b), d) zugesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte mittels einer Eichkurve.

12.6.2. Bestimmung durch Ammonolyse (nach Baddiley & Davison, 1961)

10 mg ZW wurden in einer Mischung von Ammoniak conz./Ethanol 1 : 1 (v/v) suspendiert. Nach 48h bei 37° wurden die ZW abzentrifugiert und getrocknet. Die ZW und der Überstand wurden untersucht.

12.7. Glycerin (nach König, 1979)

Hydrazinreagenz: 1.5g Glycin; 5 ml 24% Hydrazinhydrat; 0.2 ml 1M $MgCl_2$; 95 ml H_2O; (pH mit 10M KOH auf 9.8 einstellen).

Testansatz: 0.8 ml Hydrazinreagenz; 10 ul 0.02M NAD; 25 ul 0.01M ATP; 50 ul Probe; 0.1 ml H_2O.

Durchführung:
Mischen der Komponenten in Küvette. E_1 Messung bei 366 nm. Start der Umsetzung durch Zugabe von 10 µl Glycerinkinase (1 mg/ml, Boehringer) und 5 µl Glycerin-phosphat Dehydrogenase (5 mg/ml, Boehringer). Inkubation bei RT (bis 3 h) Dann erfolgte E_2 Messung.
Auswertung: Glyceringehalt = $E_2 - E_1$

12.8. Sulfat (nach Dodgston & Price, 1962)

Hydrolyse: 4N HCl 4 h bei 100° (nach Steber, 1976)
Reagenz: 2g Gelatine wurden in 400 ml H_2O von 70° gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei 4° aufbewahrt. Danach wurden 2g $BaCl_2$ zugegeben und 3 h gerührt. Nachdem die Lösung 24 h im Kühlschrank aufbewahrt worden war, wurde so abzentrifugiert, daß der Überstand noch eine schwache Trübung zeigte. Im Überstand wurden 2g $BaCl_2$ gelöst und der pH mit 2N HCl auf 2.5 eingestellt.
Meßbereich: 0.01 bis 0.20 µmol SO_4^{2-} ;
Testansatz: 0.5 ml Probe; 1 ml Reagenz;
E_1 Messung bei 366 nm gegen H_2O;
E_2 Messung nach Zentrifugation;
Auswertung: $E_{Probe} = E_1 - (E_2 + E_{Reagenz})$
($E_{Probe} = E_1 - E_2$; Testansatz enthielt anstatt Probe 0.5 ml H_2O)
Eichgerade.

12.9. Phosphat (nach Chen et al., 1956)

Oxydation: 5 mg Zellwände wurden mit 1 ml H_2SO_4 conz. versetzt. Dann wurde erhitzt bis Nebelbildung auftrat und die Zellwände sich schwarz färbten. Es wurde sodann 30%-ige H_2O_2 Lsg. zugegeben und erhitzt, bis eine klare Lsg. entstand. Die Lösung wurde mit H_2O auf 15 ml verdünnt und ein Aliquot in den Test eingesetzt.

Reagenz: 10 ml 6N H_2SO_4; 20 ml H_2O; 10 ml 2.5%-ige Ammonium-molybdat-Lsg. (Merck).
Meßbereich: 0.02 bis 0.26 µmol PO_4^{3-}
Durchführung:
Die Proben wurden in 4 ml H_2O gelöst und dann 4 ml Reagenz zugemischt. Danach wurde 2h bei 37° inkubiert. Nach beendeter Inkubation erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 680 nm. Als Blindwert diente eine Probe, die an Stelle des Reagenz H_2O enthielt.
Die Auswertung erfolgte mittels Eichgeraden.

12.10. Reduzierende Gruppen (nach Kidby & Davidson, 1973)

Der Test wurde nach Steber (1976) modifiziert.
Reagenz: 6.28g K_3PO_4 x 7 H_2O; 14.0g K_2HPO_4; 1.32g $K_3Fe(CN)_6$; mit H_2O ad 1000 ml.
Meßbereich: 0.01 bis 0.16 µmol Glucoseäquivalente.
Durchführung:
Zu 1 ml Probe wurden 0.25 ml Reagenzlsg. pipettiert und 5 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung der Proben wurden 9 ml H_2O zugegeben und die Extinktion bei 237 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte über eine Eichgerade.

12.11. Aschegehalt

Die Zellwände wurden bei 105°vorgetrocknet, sodann definierte Mengen in Porzellantiegel eingewogen und bei 550° verascht (etwa 3h). Die verwendeten Porzellantiegel wurden vorher bis zur Gewichtskonstanz bei 550° ausgeglüht.

13. Reduktion der Carbodiimid-aktivierten Uronsäuren im Zellwandpolymer (nach Taylor & Conrad, 1972)

100 mg Zellwand wurden in 10 ml H_2O suspendiert. Das Inkubationsgefäß wurde mit einem Magnetrührer versehen und in die Suspension eine pH-Wlektrode getaucht, die mit einem Digital-pH-Meter verbunden war. Mit 0.1N HCl wurde der pH der Lösung auf 4.75 eingestellt und anschließend 200 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (Sigma) zugegeben. Durch laufende Zugabe von 0.1 N HCl mit Hilfe einer 20 ul Eppendorfpipette konnte der pH des Inkubationsgemisches (Reaktion verbraucht Protonen) konstant bei 4.75 ($\pm$ 0.15) gehalten werden. Nachdem keine Protonenaufnahme mehr feststellbar war (2 h), wurde die Lösung in einem Kolben bei 50° (Wasserbad) langsam unter Rühren mit 20 ml einer 2M $NaBH_4$-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei 50° wurde das Gemisch in Eis gekühlt, das überschüssige $NaBH_4$ durch Zugabe von 2N H_2SO_4 zersetzt, die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt und schließlich gegen H_2O dialysiert. Das carboxylreduzierte ZW-Material wurde gefriergetrocknet.

14. Hydrazinolyse (nach Dimitriev et al., 1973)

15 mg carboxylreduzierte Zellwände wurden in 0.5 ml wasserfreiem Hydrazin (Aldrich), in Gegenwart von 5 mg Hydrazinsulfat für 10 h bei 105° erhitzt. Nach Abkühlen der Probe wurde das überschüssige Hydrazin durch Zugabe von Aceton in das Hydrazon überführt. Dieses Hydrazon ist relativ flüchtig und konnte im Rotationsverdampfer abgezogen werden. Der Rückstand wurde mehrmals mit Aceton und dann mit Methanol gewaschen.

15. N-Acetylierung der Aminozucker (nach Jensen, 1980)

Die in Wasser gelösten Proben (4 mg/ml) wurden mit 10%-iger NaOH (0.1 ml) alkalisiert und mit Essigsäureanhydrid (0.01 ml) versetzt. Nach 3 Min. bei RT wurden erneut 10%-ige NaOH (0.1 ml) und Essigsäureanhydrid (0.01 ml) zugegeben. Insgesamt wurde so dreimal auf diese Weise acetyliert. Anschließend wurde mit Essigsäureanhydrid der pH auf etwa 6 bis 7 gebracht und die Probe am Rotationsverdampfer mehrfach mit Wasser zur Trockne evaporiert.

16. Behandlung der Zellwände mit Perjodsäure

16.1. Allgemeine Bedingungen

a) Inkubationsgemisch:

$NaJO_4$-Lösung	: 0.05M
Puffer	: 0.05M Natriumacetat-Puffer pH 4.5
ZW-Konzentration	: 2.5 bis 5 mg/ml

b) Inkubationsbedingungen:
Native Zellwände wurden im Dunkeln bei RT bis max. 48 h inkubiert. Zur Beseitigung von Wasserstoff-Brücken zwischen der Uronosyl-carboxylfunktion und der OH-Gruppe an C3 der Uronsäurekomponenten (Scott & Tigwell, 1978), wurden native ZW vor der Behandlung mit Perjodsäure einer Ammonolyse unterzogen (s. 12.6.2.). Carboxylreduzierte ZW wurden 6 bis max. 8 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Überschüssiges Perjodat wurde durch Zugabe von Ethylenglycol (0.05 ml/ml Inkubationslösung) zerstört und das oxydierte ZW-Material abzentrifugiert. Das Pellet wurde mehrmals mit Wasser gewaschen.

c) Messung des Verbrauchs an Perjodsäure
Die Abnahme der Konzentration an Perjodsäure im Inkubationsgemisch wurde spektrometrisch bestimmt (Grado & Ballou, 1961). Dem Inkubationsgemisch wurden zu ent-

sprechenden Zeiten jeweils 20 ul entnommen, mit 2.0 ml H_2O gemischt und die Extinktion in Quarzküvetten bei 260 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgeraden konnte die entsprechende Perjodatkonzentration ermittelt werden.

16.2. "Smith-Abbau" (nach Spiro, 1966)

Das nach Perjodsäure-Behandlung erhaltene ZW-Polymer wurde in 0.1M Boratpuffer pH 8.4 gelöst und mit 0.1M $NaBH_4$ für 3 h bei RT reduziert. Danach wurde das überschüssige $NaBH_4$ durch Zugabe von Eisessig zersetzt und das ZW-Material abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann mehrmals mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

17. Spezifische Zerlegung des ZW-Polymers

10 mg carboxylreduziertes ZW-Polymer wurden einem Smith-Abbau unterzogen (s.16.2.). Danach wurde mittels Hydrazinolyse (s.14.) de-N-acetyliert. Die von überschüssigem Hydrazin befreiten Polymere wurden dann mit 2N HCl bei 100° für 3 h hydrolisiert. Nach beendeter Hydrolyse wurde die Probe am Rotationsverdampfer zur Trockne evaporiert, und der Rückstand strichförmig auf eine Cellulose DC-Platte aufgetragen. Nach Entwicklung des Chromatogrammes im Lösungsmittelsystem D wurden folgende Substanzen beobachtet:
Glycolaldehyd (R_f 0.75); Erythrit (R_f 0.51); GalN (R_f 0.26);
Das am Start verbliebene Material wurde mit H_2O eluiert und im Lösungsmittelsystem nPropanol / Ammoniak conz. / Wasser (60 : 30 : 10) auf Kieselgelplatten rechromatographiert. Es wurde nur eine Bande mit einem R_f-Wert von 0.3 beobachtet (Ninhydrin pos.). Die Substanz wurde von der DC-Platte eluiert und nach der unter (9.5.2.) beschriebenen Methode ohne weitere Hydrolyse gaschromatographisch analysiert.

18. Darstellung der D-Erythronsäure aus D-Erythrose

Allgemein:
Aldehyde lassen sich mit Quecksilber(II)-oxid zu den entsprechenden Carbonsäuren nach folgender Gleichung oxydieren:

$$RCHO + 2\ HgO \longrightarrow RCOOH + Hg_2O$$

Die Präparation der Erythronsäure erfolgte analog der, von Wohl und Schellenberg (1922) beschriebenen Oxydation von Glycerinaldehyd zu Glycerinsäure.

Reaktionsgleichung:

Erythrose	+ 2 HgO ⟶	Erythronsäure	+	Hg_2O
120.1	216.6	136.1		417.2

Durchführung:

Zu einer Lösung von 0.1g (8.3×10^{-4} Mol) D-Erythrose in 1 ml H_2O wurden 0.433g (0.002 Mol) frisch gefälltes, gelbes Quecksilber(II)-oxid zugegeben. Im Verlauf einer halben Stunde erfolgte unter Rühren Zugabe von 10 ml einer 50° heißen 0.5N Bariumhydroxyd-Lösung in 1 bis 2 ml Portionen. Die Reaktionsmischung wurde durch Kühlung mit Wasser auf 20° gehalten. Nach beendeter Zugabe der Bariumhydroxyd-Lsg. wurde der Ansatz zwei Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen; sodann Kohlendioxid bis zur Sättigung eingeleitet, kurz aufgekocht und nach Abkühlung filtriert. Das Filtrat wurde über eine Dowex H^+ Ionenaustauschersäule (1x3 cm) entsalzt. Von nicht umgesetzter Erythrose wurde die Erythronsäure mittels Ionenaustauscherchromatographie über Dowex 1 (Acetat-Form), (1x3 cm) getrennt. Nach Waschen der Säule mit Wasser (3x 10 ml), konnte reine Erythronsäure mit 10 ml 1N HCl eluiert werden. Durch Einengen des salzsauren Eluats

am Rotationsverdampfer wurde quantitativ Erythronsäure-lacton (MG: 119.1) erhalten.

Ausbeute: 0.06g = 5×10^{-4} Mol = 60.2% der Theorie.

Charakterisierung: a) Produkt zeigt keine reduzierenden Gruppen mehr.
b) Gaschromatographie des TMS-Derivats (siehe Abbildung A)

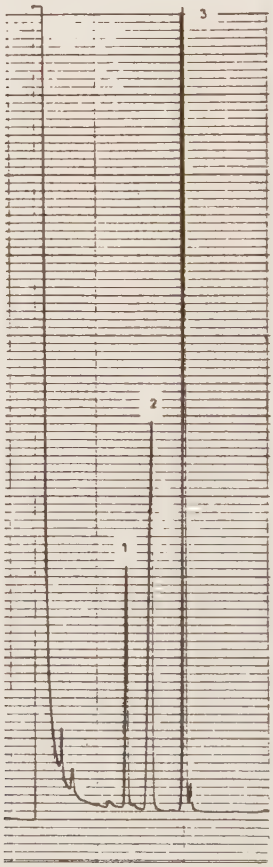
Abbildung A

Substanzpeaks:

1 : Glycerinsäure
2 : Erythronsäure-lacton
3 : Erythrit

Derivat:

Trimethylsilyl-ether



C. ERGEBNISSE

I Morphologie der Zellwandpolymere von Methanosarcina barkeri.

Aus 8 untersuchten Stämmen von Methanosarcina barkeri wurden durch Zerschlagen der Zellen mit Glasperlen (Schleifer und Kandler, 1967) und anschließender Nachreinigung mit Trypsin unlösliche Zellwandpolymere isoliert. Die Ausbeute betrug 15 bis 18%, bezogen auf gefriergetrocknete Zellen. Eine Ausnahme bildet der Stamm DSM 1232 (M. vacuolata Z.) mit etwa 30% Zellwandpolymer.

Abbildung 1 zeigt den Dünnschnitt eines typischen Zellpakets von Methanosarcina barkeri (Stamm DSM 800; Typstamm). Methanosarcina ist eindeutig gram positiv und weist sehr dicke Zellwände (bis 200 nm) auf. Die einzelnen Zellen eines derartigen Pakets besitzen gemeinsame Zellwände (siehe auch Zeikus, 1977; Kandler, 1979).
Nach Zerschlagen der Zellen mit Glasperlen und tryptischer Verdauung konnten aus allen untersuchten Stämmen Zellwandsacculi isoliert werden, die die ursprüngliche Zellform aufweisen.

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen Dünnschnitte teilweise lysierter Zellpakete, bzw. isolierter Zellwandsacculi des Stammes DSM 2053 ("Methanococcus mazei"). Wie aus den Abbildungen zu entnehmen, zeigt auch dieser Stamm die typischen Zellpakete des Sarcinatyps. Somit erlaubt die beobachtete Morphologie und die, von den anderen untersuchten Stämmen nur quantitativ abweichende Zellwandzusammensetzung (siehe Tabelle II), eine eindeutige Klassifizierung als weiteren Stamm von Methanosarcina barkeri.

Abbildung 1: Dünnschnitt eines typischen Zellpakets von Methanosarcina barkeri (Stamm DSM 800, Typstamm)

Abbildung 2: Dünnschnitt teilweise lysierter Zellpakete des Stammes DSM 2053 ("Methanococcus mazei")

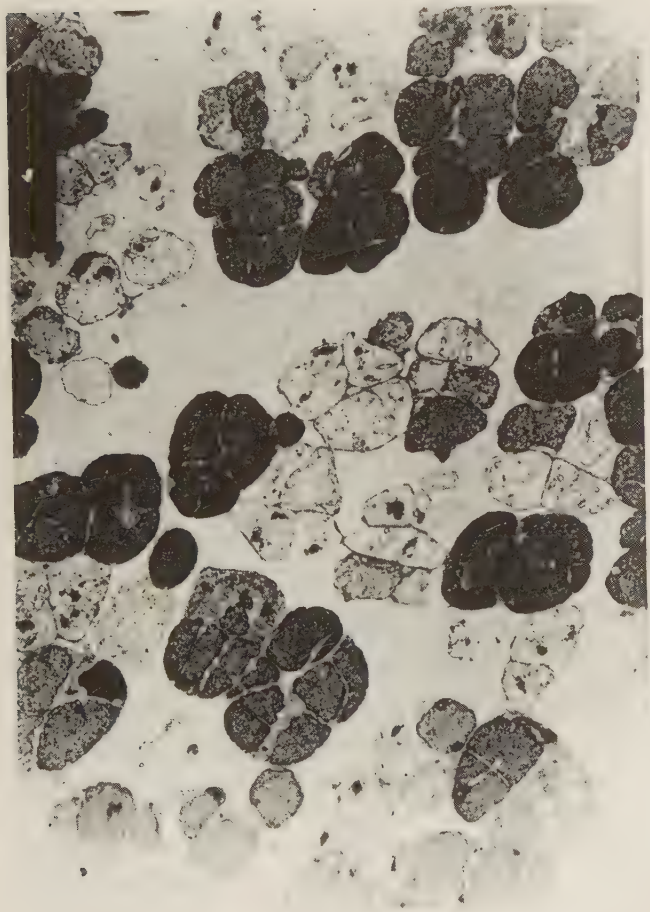
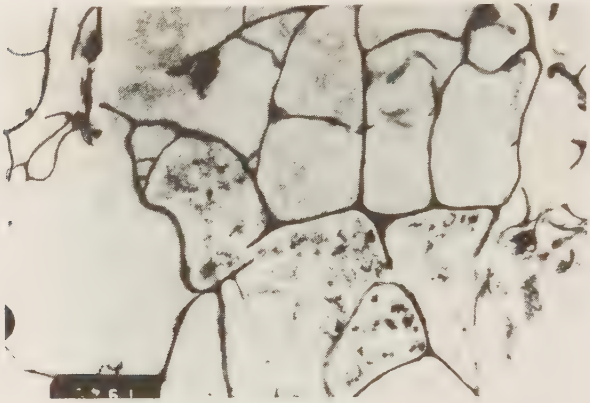


Abbildung 3: Dünnschnitt isolierter Zellwandsacculi des Stammes DSM 2053 ("Methanococcus mazei").



II Chemische Zusammensetzung der Zellwände von Methanosarcina barkeri.

1. C/N - Verhältnisse isolierter Zellwandsacculi von Methanosarcina barkeri.

Das C/N - Verhältnis isolierter Zellwandsacculi von Methanosarcina barkeri liegt zwischen 8 und 9 (Kandler und Hippe, 1977). Dieser Wert stimmt in etwa mit den analytischen Daten zur Zellwandzusammensetzung überein (Tabelle II). Da N-Acetylgalactosamin und Uronsäuren im Molverhältnis von 2 : 1 den Hauptbestandteil des ZW-Polymers darstellen, wäre ein C/N - Verhältnis von 11 zu erwarten. Der experimentell gefundene Wert von 8 bis 9 dürfte auf die, den isolierten Zellwänden anhaftenden Proteinreste zurückzuführen sein, die ein C/N - Verhältnis von 5 bis 8 aufweisen können.

2. Proteinanteil der Zellwände

Der nach tryptischer Verdauung der Rohzellwände verbleibende Proteinanteil liegt in allen untersuchten Fällen unter 3 Gewichtsprozent. Wie aus Tabelle I ersichtlich, ist die Aminosäurezusammensetzung für Peptidoglycane untypisch (Schleifer und Kandler, 1972). Da auch Muraminsäure fehlt, kann die Beteiligung von Peptidoglycanen am Aufbau des ZW-Polymers ausgeschlossen werden. Die in ZW-Präparationen des "methanogenen Konsortiums, HMR-3, Anzucht Instinok" nachweisbaren Spuren sowohl an Muraminsäure, als auch an Glucosamin stammen vermutlich aus der Zellwand, der am "Konsortium" beteiligten stäbchenförmigen, nicht methanogenen Bakterien.

3. Kohlenhydratzusammensetzung der Methanosarcina Zellwand

Die Zellwände der näher untersuchten Stämme weisen einen Kohlenhydratanteil von 50 bis 60% des Trockengewichts auf. Die Kohlenhydratkomponenten lassen sich den Klassen der Neutralzucker, Aminozucker und Uronsäuren zuordnen. Eine Übersicht über die chemische Zusammensetzung der untersuchten Stämme gibt Tabelle II. Mit den dabei verwendeten Methoden wurden in allen näher untersuchten Fällen über 80 Gewichtsprozent der Zellwände erfaßt. Wie aus Tabelle II zu entnehmen, setzen sich die ZW-Polymere der untersuchten Stämme hauptsächlich aus N-Acetyl-galactosamin und Uronsäuren im Molverhältnis 2 : 1 zusammen. Eine Ausnahme bildet der Stamm DSM 2053 mit einem Molverhältnis von etwa 3 : 1. Daneben treten bei allen untersuchten Stämmen geringe Mengen Glucose und Spuren Mannose auf. Desweiteren konnte bei 2 Stämmen neben der generell vorkommenden Glucuronsäure noch Galacturonsäure nachgewiesen werden. Das Molverhältnis der Uronsäuren zu Aminozuckern ändert sich dadurch nicht.

Tabelle I : Aminosäure-Zusammensetzung des Proteinanteils der ZW-Präparationen verschiedener Stämme von Methanosarcina (Angaben in mmol/g)

Aminosäuren	Stämme					
	DSM 804	DSM 1855	DSM 2053	DSM 1232	DSM 800	Bryant G1
Asparaginsäure	0.026	0.017	+	0.021	0.007	0.019
Threonin	0.020	0.013	+	0.016	0.006	0.016
Serin	0.019	0.014	0.097	0.015	0.007	0.054
Glutaminsäure	0.042	0.028	+	0.017	0.010	0.025
Glycin	0.035	0.027	0.033	0.024	0.018	0.037
Alanin	0.023	0.025	0.006	0.020	0.013	0.024
Valin	0.012	0.007	+	0.007	+	0.007
Lysin	0.035	0.030	0.010	+	+	0.006
Prolin	0.008	0.014	-	0.003	+	0.007

Zeichenerklärung: + = unter 0.003 mmol/g
- = nicht nachweisbar

Tabelle II : Chemische Zusammensetzung isolierter Zellwände aus 8 Stämmen von Methanosarcina

Stämme		Komponenten						
		D-Glc	D-GalN	D-GlcUA	D-GalUA	N-Acetyl	Asche	H_2O
DSM 800	% TG	3.75	27.5	16.0	-	8.3	20	14
	mmol/g	0.20	1.54	0.82	-	1.9		
DSM 804	% TG	5.0	35	14.8	-	8.7	12.2	8.4
	mmol/g	0.27	1.95	0.76	-	2.0		
BryantG1	% TG	3.8	35	3.5	14	8.6	10	14
	mmol/g	0.21	1.95	0.18	0.72	2.0		
DSM 1232	% TG	2.2	30.8	18.0	-	8.7	2.5	16
	mmol/g	0.12	1.72	0.92	-	2.0		
DSM 1855	% TG	0.5	41.45	18.8	-	10.5	8.35	14.6
	mmol/g	0.027	2.3	0.97	-	2.4		
DSM 2053	% TG	0.42	40	6.9	6.9	9.6	1	16.8
	mmol/g	0.023	2.23	0.35	0.35	2.23		
DSM 1538	% TG	3.5	20.6	11.2	-	n.b.	n.b.	n.b.
	mmol/g	0.19	1.15	0.58	-			
HMR-3	% TG	1.64	26.4	14.0	-	n.b.	n.b.	n.b.
	mmol/g	0.09	1.48	0.72	-			

3.1. Neutralzucker

Die papier,- und gaschromatographische Untersuchung von Zellwand-Hydrolysaten zeigte, daß an Neutralzuckern in allen Fällen nur Glucose in signifikanten Mengen auftritt. In Abbildung 4 sind die zweidimensionalen Papierchromatogramme der Partialhydrolysate von 4 verschiedenen Stämmen wiedergegeben. Je nach Stamm variiert der Glucosegehalt von 0.5 bis 4% des Trockengewichts (Tabelle II). Daneben wurden gaschromatographisch noch Spuren von Mannose nachgewiesen.
Bochem et al. (1982) konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an einem thermophilen "methanogenen Konsortium", das als methanogenes Bakterium überwiegend einen Stamm von Methanosarcina barkeri enthielt, Exopolymere nachweisen. Da Glucose und Mannose als Komponenten dieser Exopolymere auftreten (S.Schoberth, pers. Mitteilung), kann vermutet werden, daß die Neutralzuckermengen der hier untersuchten Zellwände von Methanosarcina auf Reste derartiger Exopolymere zurückzuführen sind. Allerdings wurden an anderen Stämmen von Methanosarcina als "HMR-3 Instinok" bis jetzt keine Exopolymere beschrieben.

3.2. Uronsäuren

3.2.1. Identifizierung der Uronsäuren

Durch Hydrolyse des ZW-Polymers in Gegenwart eines stark sauren Ionenaustauschers können etwa 30% der gebundenen Uronsäuren als Monomere freigesetzt werden. Die eindeutige Identifizierung der Uronsäuren erfolgte durch Kombination zweier verschiedener Verfahren. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

Abbldung 4: Zweidimensionale Papierchromatogramme der Partialhydrolysate 4 verschiedener Stämme von Methanosarcina barkeri.

Identifizierung der Substanzflecken:

Glucuronsäure 1, Galactosamin 2, Glucose 3,
Glucuronsäurelacton 4,

Färbemittel: $AgNO_3$ / OH^-

Verfahren von Jones und Albersheim (1972)

Im ersten Schritt wurden die freigesetzten Uronsäuren zu den entsprechenden Aldonsäuren reduziert (Reduktion der Uronsäuren an C1). Die Aldonsäuren sodann mittels Ionenaustauscher-Chromatographie von den gleichzeitig entstandenen Alditolen aus Neutralzuckern abgetrennt, lactonisiert und anschließend zu den entsprechenden Alditolen reduziert (Reduktion an C6). Die Identifizierung der so erhaltenen Alditole erfolgte nach Peracetylierung mit Essigsäureanhydrid gaschromatographisch.
An dieser Stelle sind einige theoretische Überlegungen angebracht, die die Aussagekraft, der nach dieser Methodik gewonnenen analytischen Daten zumindest einschränken können. Durch Reduktion der Zucker-carbonylfunktion und der Uronosyl-carboxylfunktion zur $-CH_2OH$ Gruppe sind C1 und C6 nicht mehr unterscheidbar. Dies hat zur Folge, daß verschiedene Hexuronsäuren (ebenso Aldosen und Ketosen) nach Reduktion dieselben Alditole ergeben können. Nachfolgend sind die zu erwartenden Reduktionsprodukte aller Hexuronsäuren aufgeführt.

L-Guluronsäure ⟶ D-Gluconsäure ⟶ D-Glucitol
D-Guluronsäure ⟶ L-Gluconsäure ⟶ L-Glucitol
L-Glucuronsäure ⟶ D-Gulonsäure ⟶ L-Glucitol
D-Glucuronsäure ⟶ L-Gulonsäure ⟶ D-Glucitol
D-Taluronsäure ⟶ D-Altronsäure ⟶ D-Altritol
L-Taluronsäure ⟶ L-Altronsäure ⟶ L-Altritol
D-Altruronsäure ⟶ D-Talonsäure ⟶ D-Altritol
L-Altruronsäure ⟶ L-Talonsäure ⟶ L-Altritol
D-Galacturonsäure ⟶ L-Galactonsäure ⟶ L-Dulcit
L-Galcturonsäure ⟶ D-Galactonsäure ⟶ D-Dulcit
D-Iduronsäure ⟶ D-Idonsäure ⟶ D-Iditol
L-Iduronsäure ⟶ L-Idonsäure ⟶ L-Iditol

D-Mannuronsäure → D-Mannonsäure ⟶ D-Mannit
L-Mannuronsäure → L-Mannonsäure ⟶ L-Mannit
D-Alluronsäure → L-Allonsäure ⟶ L-Allitol
L-Alluronsäure → D-Allonsäure ⟶ D-Allitol

Wie leicht zu sehen ist, können die Alditole aus den Paaren Glucuronsäure/Guluronsäure, bzw. Taluronsäure/Altruronsäure durch die, normalerweise verwendeten nicht-asymmetrischen stationären Phasen gaschromatographisch nicht getrennt werden. Somit erlaubt ein Substanzpeak Glucitol keine Entscheidung zwischen Glucuronsäure und Guluronsäure, ebensowenig ein Altritolpeak zwischen Taluronsäure und Altruronsäure.
Alle anderen Hexuronsäuren lassen sich allerdings eindeutig ihrem abgeleiteten Alditol zuordnen.
Da nun bei allen untersuchten Stämmen entweder Glucitol alleine, oder Glucitol und Dulcit gefunden wurde, (Tabelle III) mußte nur noch zwischen Glucuronsäure und Guluronsäure weiter differenziert werden. Dies gelingt durch Anwendung des Verfahrens von Perry und Hulyalkar (1967). Dazu wurden die nach oben beschriebener Methode isolierten Aldonolactone persilyliert und gaschromatographisch aufgetrennt. Glucuronsäure sollte demnach Gulonsäurelacton und Guluronsäure Gluconsäurelacton ergeben. Gluconsäurelacton und Gulonsäurelacton sind im Handel erhältlich und fanden als Referenzverbindungen Verwendung.
In allen untersuchten Fällen wurde ausschließlich Gulonsäurelacton allein bzw. Gulonsäurelacton und Glactonsäurelacton nachgewiesen (Tabelle III). Dies beweist, daß in allen untersuchten ZW-Polymeren entweder nur Glucuronsäure oder im Fall der Stämme Bryant G1 bzw. DSM 2053 (M. mazei), Glucuronsäure und Glacturonsäure enthalten sind.

Abbildung 5: Aufarbeitungsschema zum qualitativen Nachweis der Uronsäuren

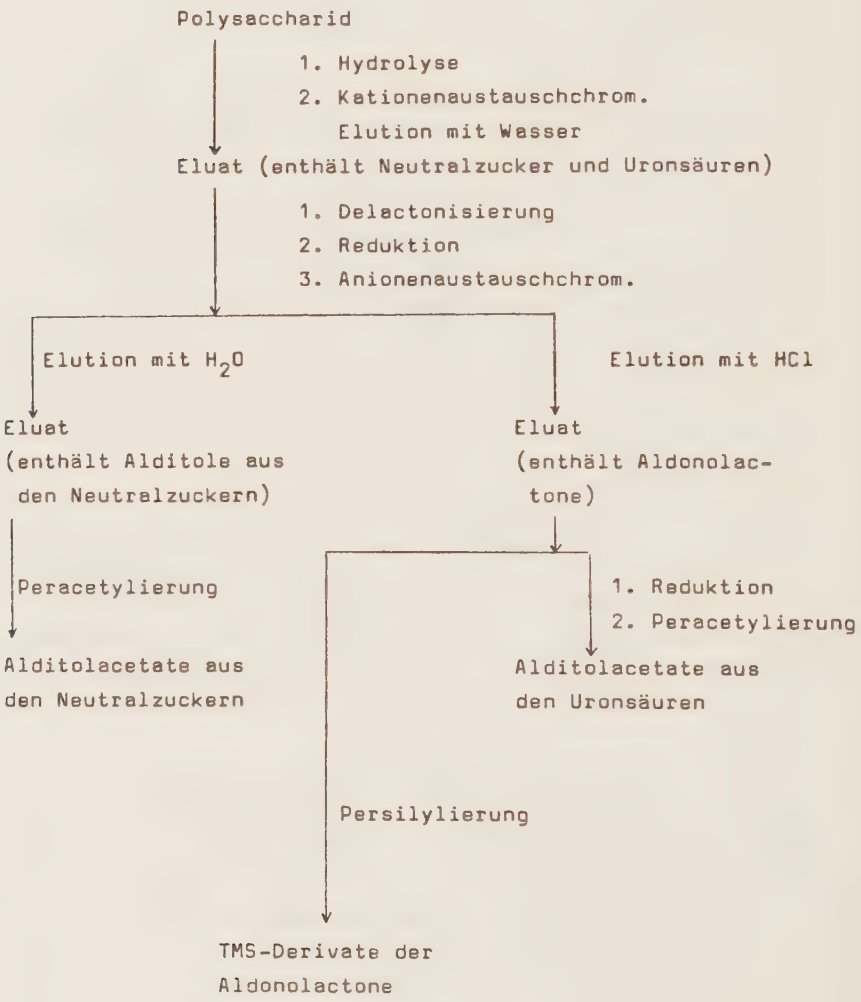


Tabelle III : Identifizierung der, aus den Uronsäuren erhaltenen Aldonsäuren bzw. Alditole

Alditole	Stämme						
	DSM 800	DSM 804	DSM 1232	DSM 1855	DSM 2053	BryantG1	HMR-3
Glucitol	+	+	+	+	+	+	+
Dulcit	-	-	-	-	+	+	-
Aldonsäuren							
Gulonsäure	+	+	+	+	+	+	+
Galactonsäure	-	-	-	-	+	+	-

Zeichenerklärung: + = nachgewiesen
- = nicht nachweisbar
Außer den hier aufgeführten Alditolen und Aldonsäuren wurden keine weiteren beobachtet.

3.2.2. Quantitative Bestimmung der Uronsäuren

Der Uronsäuregehalt der verschiedenen Zellwände entspricht etwa 50 Molprozent der Gesamtmenge der N-Acetyl-aminozucker (Tabelle II). Eine Ausnahme bildet der Stamm DSM 2053 (M. mazei), dessen ZW-Uronsäuregehalt nur etwa 30% der N-Acetyl-aminozuckermenge beträgt. Die Bestimmung des molaren Verhältnisses von Galacturonsäure zu Glucuronsäure erfolgte im Fall DSM 2053 gaschromatographisch. Sowohl die, aus den Uronsäuren erhaltenen Alditole, als auch die, aus den Uronsäuren gebildeten Aldonolactone ergaben für Galacturonsäure zu Glucuronsäure annähernd ein Verhältnis von 1 zu 1.
Das Molverhältnis der Uronsäuren des Stammes Bryant G1 wurde durch Vergleich der Neutralzuckerzunahme unbehandelter und carboxylreduzierter Zellwände (siehe unten) zu Galacturonsäure zu Glucuronsäure = 4 zu 1 ermittelt. Alle anderen untersuchten Zellwände enthalten nur Glucuronsäure.

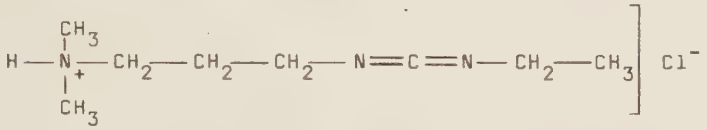
3.2.3. Reduktion der Uronosyl-carboxylfunktion im ZW--Polymer

Zur Theorie:

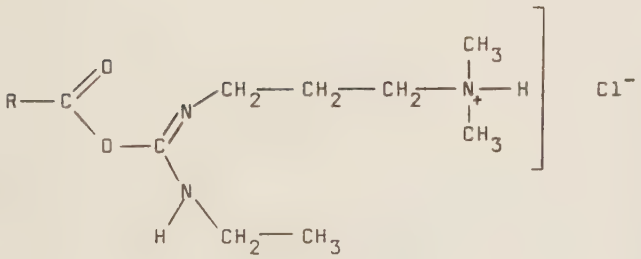
Die Umsetzung von Uronsäuren in Glycosaminoglycuronanen mit 1-(-3-Dimethylaminopropyl-)-3-ethylcarbodiimid/HCl (I) und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid ist eine konventionelle Methode zur Überführung der Uronsäuren in die entsprechenden Neutralzucker. Taylor und Conrad (1972) vermuteten eine, durch Carbodiimid katalysierte Lactonisierung der Uronsäuren im Polymer. Reduktion dieser Uronsäurelactone mit Natriumborhydrid sollte dann die entsprechenden Hexosen ergeben. Dagegen konnten Inoue und

Nagasawa (1982) die Bildung von O-Acylisoharnstoff Derivaten (II) aus der Uronosyl-carboxylfunktion und Carbodiimid nachweisen. Desweiteren ließen sich diese Derivate isolieren und mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Hexosen reduzieren. Eine intramolekulare Veresterung der Uronsäuren konnte ausgeschlossen werden.

(I)



(II)



3.2.4. Chemische Zusammensetzung carboxylreduzierter Zellwände von Methanosarcina barkeri

Eine Übersicht über die chemische Zusammensetzung carboxylreduzierter Zellwände der Stämme DSM 804 (fusaro) und Bryant G1 geben die Tabellen IV und V. Mit den dabei verwendeten Methoden wurden über 90 Gewichtsprozent der ZW erfaßt.

Tabelle IV : Vergleich der Zusammensetzung carboxylreduzierter,- und nativer Zellwände des Stammes DSM 804 (fusaro)

	ZW reduziert		ZW unbehandelt	
Komponenten	mmol/g	% TG	mmol/g	% TG
Glucose	1.13 0.64[a)]	20.4 11.6[a)]	0.23 0.21[a)]	4.1 3.8[a)]
Galactosamin	2.72 2.85[b)]	48.7 51.0[b)]	1.47 1.88[b)]	26.3 33.7[b)]
Glucuronsäure	0.20	3.9	0.83	16
N-Acetyl	2.8	12.0	1.9	8.2
Wasser		10		16.8
Asche		2.5		7

Zeichenerklärung: a) Maximalwerte ermittelt durch Hydrolyse Kinetik (2N HCl 2h, 98°)
b) Werte bestimmt nach De-N-acetylierung (0.2N HCl 12h, 100°) mit der MBTH-Methode

Tabelle V : Vergleich der Zusammensetzung carboxylreduzierter,- und nativer Zellwände des Stammes Bryant G1

	ZW reduziert		ZW unbehandelt	
Komponenten	mmol/g	% TG	mmol/g	% TG
Glucose	0.37	6.57	0.21	3.8
Galactose	0.6	10.8	-	-
Galactosamin	1.83 2.0[a)]	32.8 35.8[a)]	1.95	34.9
Glucuronsäure plus Galacturonsäure	0.15	2.9	0.90	17.5
N-Acetyl	1.95	8.4	2.0	8.6
Wasser		16.4		14
Asche		10		10

Zeichenerklärung: a) Werte bestimmt nach De-Nacetylierung (0.2N HCl 12h, 100°) mit der MBTH-Methode.
- = nicht nachweisbar

Vergleich des Neutralzuckergehals carboxylreduzierter,- und unbehandelter Zellwände, sowie die gefundenen Werte der Resturonsäuremengen ergeben in beiden Fällen eine Reduktionsrate der im ZW-Polymer enthaltenen Uronsäuren von etwa 80%. Aus dem Chemismus der Reduktion folgt unmittelbar, daß mindestens 80% der Uronsäurekomponenten freie Carboxylfunktionen aufweisen. Zellwände von Methanosarcina barkeri sind somit aus sauren Heteropolysacchariden aufgebaut.
Durch Wiederholung der Reduktionsprozedur kann die Reduktionsrate der Uronsäuren im ZW-Polymer auf etwa 90% erhöht werden. Allerdings treten dadurch hohe Verluste an isolierbarem ZW-Material auf. Ursache ist vermutlich die starke Alkalinität der, zur Reduktion des Uronosyl--O-acylisoharnstoff Derivates angewandten Natriumborhydrid-Lösung. Um genügend Untersuchungsmaterial zu erhalten wurde deshalb auf Mehrfachreduktion verzichtet.

3.2.5. Konfigurationsbestimmung der Uronsäuren

Die oben beschriebene Reduktion der Uronsäuren im ZW-Polymer der Stämme DSM 804 (fusaro) und Bryant G1 ermöglicht die Bestimmung der Konfiguration mittels Umsetzung der gebildeten Hexosen durch stereospezifische Enzyme.
(für D-Glucose die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und für D-Galactose die Galactose Dehydrogenase).
Die quantitative, enzymatische Bestimmung der gebildeten Hexosen ergab im Fall des Stammes DSM 804 ausschließlich D-Glucose. Andere Hexosen oder auch Pentosen traten nicht auf (gaschromatographische Analyse von Hydrolysaten). Zusammen mit den Ergebnissen zur Identifizierung der Uronsäuren (Tabelle III) kann somit als gesichert gelten, daß die Uronosylkomponente des ZW-Polymers des Stammes DSM 804 (fusaro) nur aus D-Glucuronsäure besteht.

Im Fall des Stammes Bryant G1 wurden ausschließlich D-Glucose und D-Galactose nachgewiesen. Das Molverhältnis der zusätzlich gebildeten D-Glucose zu D-Galactose beträgt 1 zu 4.
Zusammen mit den Ergebnissen zur Identifizierung der Uronsäuren (Tabelle III) folgt hieraus, daß die Uronosylkomponente im ZW-Polymer des Stammes Bryant G1 aus D-Glucuronsäure und D-Galacturonsäure besteht. Das Molverhältnis beträgt 1 zu 4.

3.3. Aminozucker

3.3.1. Identifizierung der Aminozucker

Die papier,- und gaschromatographischen Untersuchungen, sowie die Analyse von ZW-Hydrolysaten mit dem Aminosäure--Analysator zeigten übereinstimmend, daß in allen untersuchten Stämmen ausschließlich Galactosamin als Aminozuckerkomponente der ZW-Polymere auftritt.
Muraminsäure und Glucosamin sind in den Zellwänden der untersuchten Stämme von Methanosarcina barkeri nicht vorhanden. Die in der ZW-Präparation des "methanogenen Konsortiums" HMR-3, Anzucht Instinok vorhandenen Mengen an Muraminsäure und Glucosamin dürften auf das ZW-Polymer eines, am Konsortium beteiligten, nichtmethanogenen, stäbchenförmigen Bakteriums zurückzuführen sein.

3.3.2. Quantitative Bestimmung des Galactosamins

Die quantitative Freisetzung der Aminozucker aus den ZW--Polymeren der untersuchten Stämme von Methanosarcina ist aus zwei Gründen schwierig.

1. Die glycosidische Bindung der Uronsäurekomponenten im ZW-Polymer ist bekanntlich gegen Hydrolyseversuche mit Protonensäuren sehr stabil. Verantwortlich

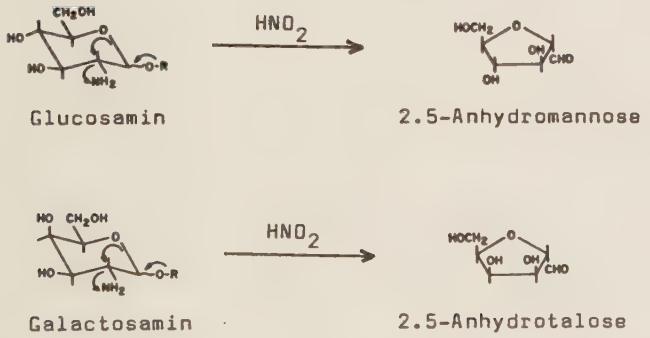
dafür ist der "elektronenabziehende Effekt" der Uronosyl--carboxylfunktion, sodaß der Ringsauerstoff nur schwer von Protonen angegriffen werden kann.

2. Die H^+ katalysierte Spaltung der Glycosidbindung der N-acetylierten Aminozuckerkomponenten läuft etwa mit der gleichen Geschwindigkeit ab, wie die Hydrolyse der N-acetyl-Bindung (Porter, 1975). Somit entstehen im Lauf der Hydrolyse sehr schnell Aminozuckerglycoside, die eine freie NH_2-Gruppe aufweisen. Im sauren liegen diese als NH_3^+-Gruppen vor.
   Die positive Ladung führt zum induktiven Abzug von Ladung aus der Glycosidbindung, sodaß diese nur noch sehr schlecht von Protonen angegriffen wird. Das Ergebnis ist eine erhöhte Resistenz derartiger Glycoside gegen saure Hydrolyseversuche.

Um die erwähnten Schwierigkeiten zu umgehen, wurden die Uronsäuren im ZW-Polymer zu den entsprechenden Neutralzuckern reduziert. Damit wurde die Hydrolyseresistenz dieser Glycosidbindungen aufgehoben.
Die quantitative Bestimmung der Aminozucker in monomerer Form gelingt dann durch desaminativen Abbau mittels Behandlung mit Salpetriger Säure, nach vorhergehender De-N-acetylierung der Aminozuckerkomponenten im ZW-Polymer.
Eine schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 6 wiedergegeben (nach Porter, 1975).
Wie zu sehen ist, ergeben 2-Desoxy-2-aminohexosen mit äquatorialer NH_2-Gruppe 2.5-Anhydrohexosen.
Hingegen liefern 2-Desoxy-2-aminohexosen mit axialer NH_2--Gruppe unter Konfigurationsumkehr an C2 das Hydroxyl--Substitutionsprodukt (Hexose).
Galactosamin ergibt nach desaminativem Abbau 2.5-Anhydrotalose. Die in den Tabellen IV und V angegebenen Werte der Aminozuckergehalte wurden auf die oben beschriebene

Weise gewonnen. Da ausschließlich 2.5-Anhydrotalose beobachtet wurde, kann dies als weitere Beweis für das alleinige Vorhandensein von Galactosamin als Aminozuckerkomponente in den untersuchten Zellwänden von Methanosarcina barkeri gelten.
In allen anderen Untersuchungen wurden 2.5 -Anhydrotalose bzw. Glycoside der 2.5 -Anhydrotalose nicht isoliert, sondern durch einen, von Tsuij et al. (1969a, 1969b) beschriebenen, spezifischen Farbtest (MBTH Methode) quantifiziert. Hier finden sich auch Angaben über den Reaktionsmechanismus der Pigmentbildung, auf den ich hier nicht näher eingehe.

Abbildung 6: Reaktionsschema der Desaminierung von Glucosamin und Galactosamin mit HNO_2 (nach Porter,1975)



Glucosamin — 2.5-Anhydromannose

Galactosamin — 2.5-Anhydrotalose

3.3.3. Konfigurationsbestimmung des Galactosamins

Die Konfigurationsbestimmung papierchromatographisch aufgereinigter Galactosaminfraktionen aus den Totalhydrolysaten (16h 4N HCl bei 100°) erfolgte durch Umsetzung mit D-Galactose Oxidase (EC 1.1.3.9 aus Dactylium dendroides). Dieses Enzym ist in der Lage, auch D-Galactosamin zu oxydieren (Avigad et al., 1962).
Die Galactosaminfraktionen aller untersuchten ZW-Hydrolysate wurden durch D-Galactose Oxidase umgesetzt. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Galactosaminkomponente der Methanosarcina Zellwand die D-Konfiguration besitzt.

4. Anorganische Bestandteile von Methanosarcina ZW-Präparationen

Der Sulfatgehalt der untersuchten Zellwände liegt in allen Fällen unter 0.4 Gewichtsprozent (Tabelle VI). Somit kann das Vorliegen sulfatisierter ZW-Polymere ausgeschlossen werden. Der Phosphatgehalt ist generell sehr niedrig (Tabelle VI). Nur die Stämme DSM 800 (Typstamm) und DSM 804 (fusaro) weisen mit 1.6 Gewichtsprozent bzw. 1.4% etwas erhöhte Werte auf. Das Fehlen von Glycerin oder Ribitol in ZW-Hydrolysaten der untersuchten Stämme läßt auch die Beteiligung von Teichonsäuren am Aufbau der ZW-Polymere als unwahrscheinlich erscheinen.

Tabelle VI : Phosphat,- und Sulfatgehalt isolierter Zellwände verschiedener Stämme von Methanosarcina

		Stämme					
		DSM 800	DSM 804	Bryant G1	DSM 1855	DSM 2053	DSM 1232
PO_4^{3-}	% TG	1.6	1.4	0.53	0.14	0.112	0.67
	mmol/g	0.17	0.15	0.056	0.015	0.012	0.07
SO_4^{2-}	% TG	0.35	0.18	0.13	0.20	0.18	0.18
	mmol/g	0.036	0.018	0.013	0.020	0.018	0.018

5. Chemische Zusammensetzung wasserlöslicher Zellwandpräparationen von Methanosarcina barkeri

Durch Behandlung mit einer 10%-igen, wässrigen Natriumborhydrid-Lösung bei 60° für 12h konnten Trypsin-gereinigte Zellwände von 4 verschiedenen Stämmen von Methanosarcina barkeri quantitativ in Lösung gebracht werden. Nach Dialyse gegen Wasser (Ausschlußvolumen: 10 000 Dalton) und anschließender Gefriertrocknung wurden weiße, voluminöse Substanzen erhalten. Da diese Präparationen jedoch nicht mehr vollständig in Lösung gebracht werden konnten, wurde jeweils mit 2N HCl bei 98° für 2 bis 3 Min. nachbehandelt, dann sofort mit $NaHCO_3$ neutralisiert, abermals gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die so erhaltenen ZW-Lyophilisate sind in Wasser vollständig löslich. Die Ausbeute beträgt 50 bis 60% bezogen auf die eingesetzte Menge an Zellwand in Gramm.
Wie aus Tabelle VII ersichtlich bestehen zwischen nativen und wasserlöslichen Zellwänden keine wesentlichen Unterschiede in der Gesamtzusammensetzung.

6. Versuche zur enzymatischen Spaltung der Zellwand-Polymere

Nach Inkubation nativer und wasserlöslicher ZW-Präparationen mit Chondroitinase ABC (Chondroitin: ABC Lyase EC 4.2.2.4) Chondroitinase AC (Chondroitin: AC Lyase EC 4.2.2.5) und Hyaluronidase (Hyaluronoglucosidase, Hyaluronat 4-Glycanohydrolase EC 3.2.1.35) konnten papierchromatographisch keine Mono,- und/oder Oligosaccharide nachgewiesen werden. Anscheinend verhindert der, im Polymer vorhandene, pro Uronsäurerest zusätzliche Aminozucker einen Angriff der oben genannten Enzyme.

Tabelle VII : Chemische Zusammensetzung wasserlöslicher Zellwandpräparationen verschiedener Stämme von Methanosarcina

Stämme		Komponenten			
		Glucose	Glucuronsäure	Galacturonsäure	Galactosamin
DSM 800	% TG	0.8	16.6	-	35.5
	mmol/g	0.04	0.85	-	1.98
DSM 1538	% TG	2.7	13.6	-	30
	mmol/g	0.15	0.7	-	1.66
DSM 1855	% TG	0.4	18.9	-	40.6
	mmol/g	0.02	0.97		2.26
Bryant G1	% TG	3.2	n.b.	21.0[a)]	39.3
	mmol/g	0.177		1.08	2.19

Zeichenerklärung: - = nicht nachweisbar
n.b. = nicht bestimmt
a) = Dieser Stamm enthält Galacturonsäure und Glucuronsäure, der angegebene Wert stellt die Summe der Uronsäuren dar.

III Versuche zur Strukturaufklärung

1. Smith-Abbau unbehandelter Zellwände

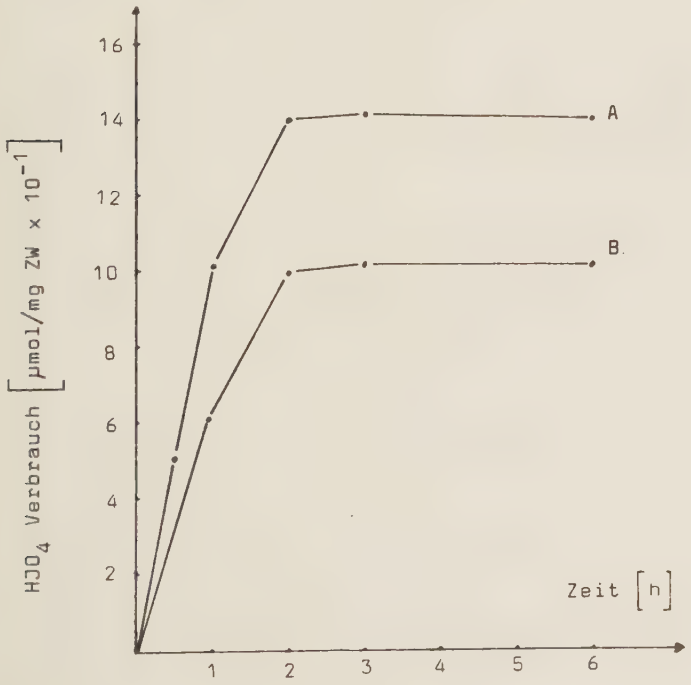
Behandlung der Zellwände verschiedener Stämme von Methanosarcina mit Perjodsäure führt zum vollständigen Abbau der Uronsäuren im jeweiligen Polymer (Carbazol Test).
Nach Reduktion der, mit Perjodsäure behandelten Zellwände und anschließender Hydrolyse konnten Erythronsäure, Erythrit, Galactosamin sowie Spuren an Glycerin nachgewiesen werden. Erythronsäure ist das zu erwartende Abbauprodukt für C4 substituierte Glucuronsäuren. Erythrit dürfte aus der Glucosekomponente entstanden sein und läßt auf C4 Substitution schließen.
Veränderungen des Aminozuckergehalts wurden in diesen Versuchen nicht quantifiziert. Das für Galactosamin mögliche Abbauprodukt Threitol wurde nicht beobachtet, was gegen einen Abbau dieser ZW-Komponente durch Perjodsäure spricht.

2. Smith-Abbau carboxylreduzierter Zellwände

Untersucht wurden Zellwände der Stämme DSM 804 (fusaro) und Bryant G1. Eine Übersicht über die chemische Zusammensetzung der carboxylreduzierten ZW nach Behandlung mit Perjodsäure und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid ist in Tabelle VIII enthalten.
Die Ausbeute an isolierbaren Oxydationsprodukten beträgt in beiden Fällen etwa 75 Molprozent bezogen auf die eingesetzten Mengen an Zellwandmaterial. Die Molverhältnisse der ZW-Komponenten bzw. die der Abbauprodukte ändern sich gegenüber unbehandelten ZW nicht. Da N-Acetyl-galactosamin in beiden untersuchten Fällen nicht abgebaut wird, die Neutralzucker und Resturonsäuren hingegen quantitativ oxydiert werden, kann unter Berücksichtigung der Abbauprodukte Erythrit im Fall von DSM 804 (fusaro) bzw. Erythrit und Threitol im Fall von Bryant G1 der Verbrauch von einem mol HJO_4 pro mol Neutralzucker und Resturonsäure angenommen werden.

Für die carboxylreduzierte ZW von Stamm DSM 804 (fusaro) wäre somit ein Perjodsäureverbrauch von 1.33 mmol/g zu erwarten.
Dies stimmt mit dem aus der HJO_4 Verbrauchskurve hervorgehenden Wert (1.4 mmol/g) gut überein. Gleiches gilt für den Fall Bryant G1 (siehe Abbildung 7).
Somit kann für die Uronsäurekomponenten in beiden untersuchten ZW-Polymeren eine Substitution am C4 als erwiesen gelten. Einfachsubstitutionen am C6 der Galactosaminreste können wegen der Resistenz gegenüber Perjodsäure ausgeschlossen werden.

Abbildung 7: HJO_4 Verbrauchskurve



A: DSM 804 (fusaro)
B: Bryant G1

Tabelle VIII : Produktanalyse nach Smith-Abbau carboxylreduzierter Zellwände der Stämme DSM 804 und Bryant G1
(Angaben in mmol/g)

Komponenten	Stämme	
	DSM 804	Bryant G1
Galactosamin	2.05	1.2
Neutralzucker	-	-
Uronsäuren	-	-
Erythrit	0.84	0.20
Threit	-	0.45
Glycolaldehyd	1.25	n.b.
Glycerinaldehyd	-	n.b.
HJO_4-Verbrauch	1.4	1.0

Zeichenerklärung: - = nicht nachweisbar
n.b. = nicht bestimmt

3. Isolierung und Analyse charakteristischer Bruchstücke der Methanosarcina Zellwand.

Papierchromatographie von Partialhydrolysaten (2N HCl / 2h / 100°) aller untersuchten Stämme zeigten die Anwesenheit einer charakteristischen Bande mit einem R_{GlcN} von 0.58 bis 0.59 (Lösungsmittel Fischer Nebel). Diese Banden sind $AgNO_3/OH^-$ und Ninhydrin positiv. .
Nach Elution und Chromatographie mittels Aminosäureanalysator werden im Fall ausschließlich Glucuronsäure enthaltender ZW-Polymere, Doppelpeaks mit R_{NH_3}-Werten von 0.12 und 0.135 beobachtet. In Fällen Galacturonsäure enthaltender ZW-Polymere tritt ein weiterer Doppelpeak mit R_{NH_3}-Werten von 0.18 und 0.20 auf.
Die Analyse der isolierten Banden, die nur Glucuronsäure enthalten ergibt eine Zusammensetzung aus Glucuronsäure und Galactosamin im Verhältnis von 1 : 1. Näher untersucht wurden isolierte Banden aus den ausschließlich Glucuronsäure enthaltenden ZW-Polymeren der Stämme DSM 800 (Typstamm) und DSM 804 (fusaro).
Das Ergebnis ist in Tabelle IX zusammengestellt. Die Bestimmung der reduzierenden Gruppen ergibt in beiden Fällen 50 mol% der Summe der Komponenten. Es handelt sich demzufolge um ein Disaccharid aus Glucuronsäure und Galactosamin.
Beide Disaccharide ergaben sowohl im Elson Morgan, als auch im Morgan-Elson Test (nach N-Acetylierung) eine positive Reaktion. Dies zeigt eine freie Hydroxyl-Gruppe am C1 des Galactosamins an.
Die Verschiebung des Absorptionsverhältnisses im Elson Morgan Test von E_{540nm} / E_{510nm} = 1.35 für Aminozucker mit einer nicht substituierten Hydroxyl-Gruppe am C3 zu 0.36 bzw. 0.39 zeigen eine C3 Substitution für beide Disaccharide an (Cifonelli & Dorfman, 1960).

Tabelle IX : Analyse der, aus zwei verschiedenen Stämmen von Methanosarcina isolierten Aldobiuronsäuren.
Hydrolysebedingung: 2h 2N HCl 98°
Chromatographie : 1. Lösungsmittelsystem D
2. Papierelektrophorese

	Stämme		Standardsubstanzen		
	DSM 800 (Typst.)	DSM 804 (fusaro)	Chondrosin	GalN	GalNAc
GlcUA/GalN	1.10	1.04	1.12	-	-
$\frac{\text{red. Gruppen}}{\text{GlcUA}}$	1.07	1.00	1.00	-	-
E_{540}/E_{510} a)	0.36	0.39	0.30	1.35	-
$\varepsilon_{(578nm)}$ b)	9952	10730	9529	-	1792

a) Elson-Morgan-Test
b) Morgan-Elson-Test

Nach N-Acetylierung reagieren beide Disaccharide im Elson Morgan Test positiv, ein Beweis für freie Hydroxylfunktionen an C1 und C4 des Galactosaminrestes (Mayer et al., 1974). Der etwa um den Faktor 5 erhöhte Extinktionskoeffizient der beiden Disaccharide im Morgan Elson Test gegenüber einem N-Acetyl-Galactosamin Standard ist ein weiterer Hinweis für eine Substitution an C3 der Galactosaminreste. Die Struktur der beiden untersuchten Disaccharide ergibt sich somit zu:

Glucuronsäure - (1⟶3) - Galactosamin

Bestimmung der anomeren Konfiguration.
Die anomere Konfiguration wurde am Disaccharid aus dem ZW-Polymer des Stammes DSM 800 (Typstamm) mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die ^{1}-H-NMR-Spektroskopie kann Informationen über den Dihedralwinkel zwischen Protonen an benachbarten C-Atomen in alizyklischen Verbindungen liefern. Diese Winkel sind über die Konformation der Ringsubstituenten interpretierbar.
Das Resonanzsignal des anomeren Protons läßt sich den komplexen NMR-Spektren von Zuckern, auf Grund der beobachteten chemischen Verschiebung am einfachsten zuordnen. Wegen der Kopplung mit dem Proton am benachbarten C-Atom2 erscheint das Resonanzsignal des anomeren Protons gewöhnlich als Doublet. Die empirisch gefundenen spin-spin Kopplungskonstanten für 1,2 diaxiale Protonen an benachbarten C-Atomen $J_{ax\ ax}$ (7 - 11Hz) sind größer als die Kopplungskonstanten für 1,2 axial, äquatoriale $J_{ax\ äqu}$, und 1,2 diäquatoriale $J_{äqu\ äqu}$ Protonen (1 - 4 Hz). Desweiteren absorbieren axiale Protonen meist bei höherem Feld als äquatoriale Protonen. So absorbieren axiale anomere Protonen von O-Glycosiden gewöhnlich bei δ-Werten unter 5.00. Äquatoriale anomere Protonen hingegen absorbieren meist bei δ-Werten höher als 5.00 (Vliegenhart et al., 1981).

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die ^{1}H-NMR-Spektren eines Chondrosin Standards (β-D-Glucuronsäure-(1→3)-D-Galactosamin) bzw. des, aus dem ZW-Polymer des Stammes DSM 800 (Typstamm) isolierten Disaccharides (D-Glucuronsäure-(1→3)-D-Galactosamin).
Wie leicht zu sehen, sind die beiden Spektren bis auf geringe Unterschiede der relativen Intensitäten von Resonanzsignalen im Bereich höherer Feldstärken identisch.

Beide Spektren zeigen im sogenannten "Anomeren Bereich" drei charakteristische Doublets.

Chondrosin (Standardsubstanz)

1) δ = 4.56 ppm (J_{12} = 7.47 Hz)
2) δ = 4.78 ppm (J_{12} = 8.474 Hz)
3) δ = 5.36 ppm (J_{12} = 3.7 Hz)

Disaccharid aus dem ZW-Polymer des Stammes DSM 800

1) δ = 4.59 ppm (J_{12} = 7.55 Hz)
2) δ = 4.78 ppm (J_{12} = 8.45 Hz)
3) δ = 5.39 ppm (J_{12} = 3.65 Hz)

Die Werte der chemischen Verschiebungen bzw. der Kopplungskonstanten der Resonanzsignale bei δ = 4.56 ppm (J_{12} = 7.47 Hz) des Chondrosins und δ = 4.59 ppm (J_{12} = 7.55 Hz) des Disaccharids aus dem ZW-Polymer des Stammes DSM 800 stimmen mit den von Welti et al., (1979) gefundenen δ-Werten bzw. Kopplungskonstanten der Anomeren Protonen in den Verbindungen Methyl- β -D-glucopyranosiduronat δ = 4.376 ppm (J_{12} = 8.0 Hz) und der β-D-Glucopyranosiduronat Einheit des Hyaluronsäurepolymers δ = 4.457 ppm (J_{12} = 7.7 Hz) gut überein.

Da sowohl die Glucuronsäure Einheit des Chondrosins als auch die Glucuronsäure Einheit des zu untersuchenden Disaccharids die D-Konfiguration aufweisen, folgt aus der diaxialen Konformation der Protonen an den benachbarten C-Atomen 1 und 2 der Glucuronsäure Einheit, daß im Chondrosin und im hier untersuchten Disaccharid die glycosidische Verknüpfung der Glucuronsäure mit dem C-Atom 3 des Galactosamins die Konfiguration β besitzt.

Den Anomeren Resonanzsignalen bei δ = 4.78 ppm (J_{12} = 8.474 Hz) im Chondrosinspektrum und δ = 4.78 ppm (J_{12} = 8.45 Hz) im NMR-Spektrum des Disaccharids kann auf Grund der eingangs erwähnten allgemeinen Kriterien (δ-Wert unter 5.00 ppm und zugehörige Kopplungskonstante zwischen 7 und 11 Hz) das β-Anomer das D-Galactosamins zugeordnet werden.
Aus der Anwendung derselben Kriterien auf die Resonanzsignale bei δ = 5.36 ppm (J_{12} = 3.7 Hz) des Chondrosinspektrums bzw. δ = 5.39 ppm (J_{12} = 3.65 Hz) des Disaccharid Spektrums folgt die Zuordnung des α-Anomers des D-Galactosamins (δ-Werte über 5.00 ppm und Kopplungskonstanten zwischen 1 und 4 Hz).

Die vollständige Struktur des aus dem ZW-Polymer von Methanosarcina isolierten Disaccharids ergibt sich somit zu:

β-D-Glucuronsäure-(1 → 3)-D-Galactosamin

Diese Verbindung ist mit Chondrosin, der de-N-acetylierten "repeating unit" des Chondroitins identisch.

Abbildung 8: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum des Chondrosins
β-D-GlcUA-(1⟶3)-D-GalN

Lösungsmittel: D_2O

H_2O wurde gleich 4.67 ppm gesetzt

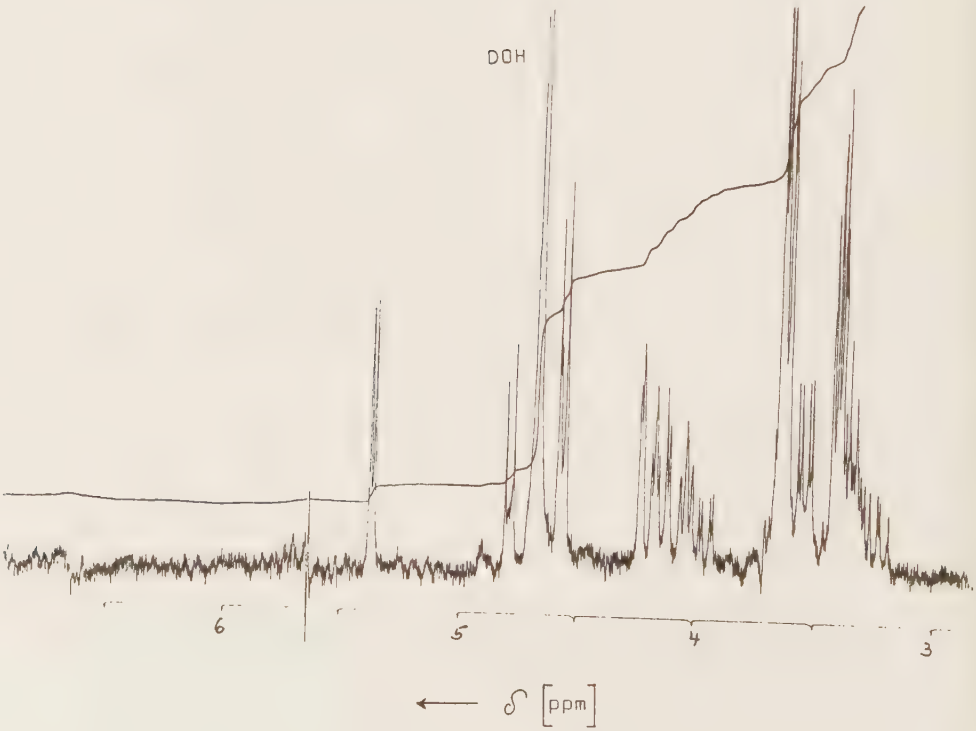
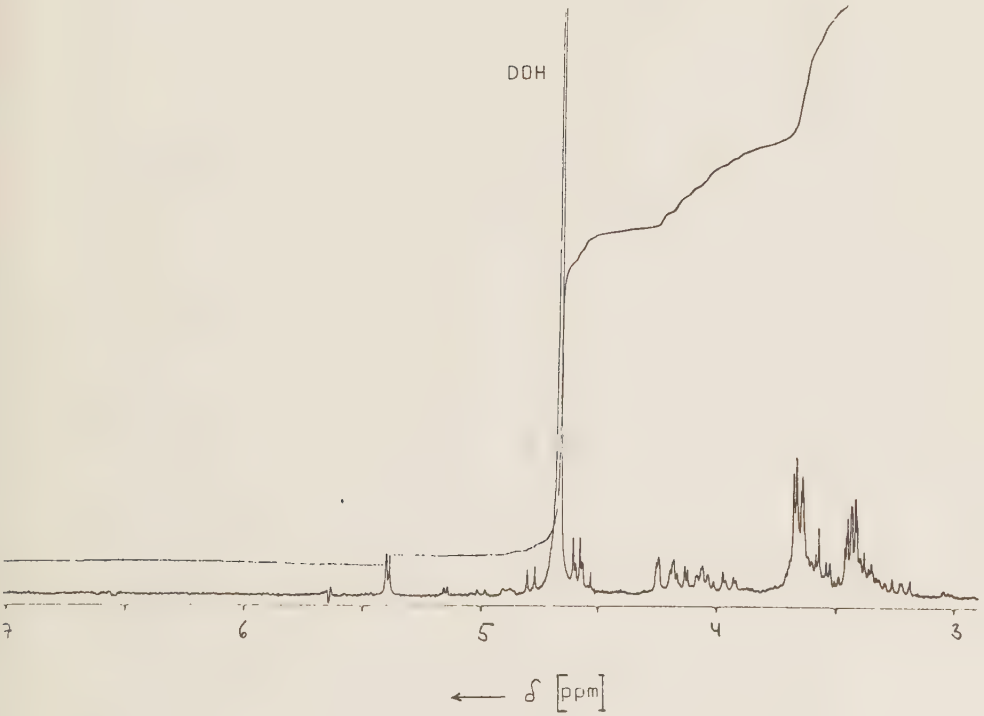


Abbildung 9: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der isolierten Aldobiuronsäure
D-GlcUA-(1⟶3)-D-GalN (aus DSM 800)

Lösungsmittel: D_2O

H_2O wurde gleich 4.67 ppm gesetzt



4. Isolierung und Struktur der, chemisch modifizierten "repeating unit" des ZW-Polymers von Methanosarcina

Carboxylreduzierte Zellwände des Stammes DSM 804 (fusaro) wurden mit Perjodsäure oxydiert und anschließend mit Natriumborhydrid reduziert (siehe Smith-Abbau). Das so vorbehandelte ZW-Material wurde dann einer Hydrazinolyse unterworfen. Da N-Acetyl-aminozucker, die am C3 einen Substituenten tragen alkalisch oder durch Hydrazin allein nur geringfügig de-N-acetylierbar sind, wurden zur Hydrazinolyse katalytische Mengen Hydrazinsulfat zugegeben (nach Dimitriev et al., 1973).
Dadurch konnten etwa 80% der, im ZW-Polymer enthaltenen Galactosamin-Reste de-N-acetyliert werden (MBTH-Test).
Aus dem, auf diese Weise gewonnenen , weitgehend de-N-acetylierten ZW-Polymer konnte nach saurer Hydrolyse (30 Min. 2N HCl bei 98°) und anschließender Dünnschicht-chromatographie (Kieselgel, Lösungsmittelsytem Ammoniak / n-Propanol / H_2O = 3 / 6 / 1,) eine Ninhydrin positive Verbindung (R_f = 0.3) isoliert werden.
Die Aubeute an dieser Verbindung betrug 40% bezogen auf die eingesetzte Menge an Galactosamin im unbehandelten ZW-Polymer.
Die gaschromatographische Produktanalyse nach desaminativem Abbau dieser Verbindung ergab 2.5-Anhydrotalose und Erythrit im Molverhältnis 2 : 1. Unter Berücksichtigung der bereits dargelegten Reaktionsmechanismen der desaminativen Spaltung Aminozucker enthaltender Polymere (siehe Abbildung 6) ergibt sich die Struktur dieses Bruchstückes der Zellwand von Methanosarcina zu:

GalN⟶GalN⟶Erythrit

D. DISKUSSION

1. Zur chemischen Zusammensetzung der Methanosarcina Zellwand

Alle 8 untersuchten Stämme von Methanosarcina barkeri haben einen festen Zellwandsacculus. Diese Zellwandsacculi bestehen im wesentlichen aus N-Acetyl-galactosamin und Uronsäuren im Molverhältnis 2 : 1. Eine Ausnahme bildet der Stamm DSM 2053 (Methanosarcina mazei) mit einem Molverhältnis von 3 : 1. Gewöhnlich enthalten die ZW-Polymere ausschließlich D-Glucuronsäure als Uronosylkomponente. Bei zwei Stämmen wird D-Glucuronsäure teilweise durch D-Galacturonsäure ersetzt (Das Molverhältnis der Gesamturonsäuren zu N-Acetyl-galactosamin ändert sich dadurch aber nicht). Neben den genannten ZW-Komponenten enthalten Methanosarcina-Zellwände noch geringe Mengen an D-Glucose und Spuren an D-Mannose. Muraminsäure oder Aminouronsäuren, wie z.B. die bei Methanobacteriales vorkommende Talosaminuronsäure wurden in keiner der untersuchten ZW-Präparationen gefunden. Desweiteren sind die, in sauren Hydrolysaten der Methanosarcina-Zellwand in geringen Mengen nachweisbaren Aminosäuren für Peptidoglycane untypisch. Vielmehr deuten die, neben Serin, Threonin, Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Lysin auftretenden Aminosäuren Valin, Tyrosin, Phenylalanin und Prolin auf das Vorliegen von Proteinresten hin, die durch Verdauung der isolierten Zellwandsacculi mit Trypsin nicht entfernt werden konnten.
Somit kann die Beteiligung von Murein oder Pseudomurein am Aufbau der Methanosarcina-Zellwand ausgeschlossen werden. Der Phosphatgehalt der Zellwände liegt mit etwa 1% weit unter den, für Teichonsäuren enthaltende ZW-Polymere zu erwartenden Werten. Da auch Glycerin und Ribitol, sowie andere Pentitole bzw. Alditole fehlen, kann die Beteiligung von Teichonsäuren praktisch ausgeschlossen werden.
Wegen der, nur in Spuren enthaltenen Sulfatmengen kann eine nennenswerte Sulfatisierung

der ZW-Polymere, wie sie bei Halococcus nachgewiesen wurde (Steber & Schleifer,1975; 1979), ausgeschlossen werden. Aus der Reduzierbarkeit der Uronosylcarboxylgruppe im intakten ZW-Polymer mittels Natriumborhydrid zur $-CH_2OH$ Gruppe kann gefolgert werden, daß mindestens 80% der Uronsäuren im ZW-Polymer freie Carboxylgruppen aufweisen. Das Strukturelement der Methanosarcina-Zellwand ist somit als saures Heteropolysaccharid zu bezeichnen.

2. Zur Struktur der Methanosarcina-Zellwand

Die Strukturaufklärung von Polysacchariden erfordert neben der Kenntnis der genauen Zusammensetzung die Fragmentierung des Polysaccharids in möglichst charakteristische Bruchstücke (Oligosaccharide). Sequenzierungsprozeduren wie sie bei Peptiden und Proteinen Anwendung finden, sind für Polysaccharide nicht bekannt. Die Analyse der isolierten Bruchstücke und anschließende logische Kombination dieser Bausteine erlauben dann Aussagen über mögliche Strukturen des intakten Polysaccharids. Der Vorgang ähnelt dem Zusammensetzen eines Puzzles, mit dem Unterschied, daß das " Bild " bei der Polysaccharid Analyse unbekannt ist. Wegen der ausgeprägten Resistenz der glycosidischen Bindung der Uronsäurekomponenten gegen H^+ katalysierte Hydrolyseversuche sind in Partialhydrolysaten Uronsäuren enthaltender Polysaccharide hohe Anteile von Uronosylglycosiden zu erwarten. Als Hauptprodukt von Partialhydrolysaten der Zellwände, die als Uronsäurekomponente ausschließlich Glucuronsäure enthalten, konnte die Aldobiuronsäure: β-D-GlcUA-(1⟶3)-D-GalN isoliert werden. Diese Verbindung erwies sich mit Chondrosin, dem Haupthydrolyseprodukt des Chondroitinsulfats (Jeanloz,1970) identisch. Die aufgrund der Stöchiometrie der intakten Zellwände möglichen Hydrolyseprodukte GalN⟶GlcUA⟶GalN; GalN⟶GalN; GlcUA⟶GalN⟶GalN; und GalN⟶GlcUA konnten nicht isoliert werden.

Um dennoch weitere Daten zur Struktur der Methanosarcina-Zellwand zu gewinnen, wurden Abbauversuche mit Perjodsäure unternommen. Durch Behandlung mit Perjodsäure können vicinale Hydroxylgruppen der Kohlenhydrat-Komponenten unter Spaltung der C — C-Bindung zu Aldehyden oxydiert werden. Nach Reduktion der so entstandenen Aldehyde mittels $NaBH_4$ und anschließender Hydrolyse kann aus der Menge und Art der entstandenen Abbauprodukte auf die Substitution der Kohlenhydrat-Komponenten geschlossen werden.

a) Perjodsäure-Abbau unbehandelter Zellwände

Die Behandlung nativer Zellwände mit Perjodsäure führt zum vollständigen Abbau der im jeweiligen ZW-Polymer enthaltenen Uronsäuren. Die gaschromatographische Produktanalyse der, als Uronsäure-Komponente nur Glucuronsäure enthaltenden Zellwände (Galacturonsäure enthaltende ZW wurden hier nicht weiter untersucht) ergab Erythrit, Erythronsäure, Spuren an Glycerin und Galactosamin. Erythronsäure ist das zu erwartende Abbauprodukt für C4 substituierte Glucuronsäuren. Erythrit dürfte aus der Glucose-Komponente entstanden sein und läßt auf C4 Substitution schließen. Veränderungen des Aminozuckergehalts wurden in diesen Versuchen nicht quantifiziert. Das für Galactosamin mögliche Abbauprodukt Threitol wurde nicht beobachtet, was gegen einen Abbau dieser ZW-Komponente durch Perjodsäure spricht.

b) Perjodsäure-Abbau carboxylreduzierter Zellwände

Untersucht wurden Zellwände der Stämme DSM 804 (fusaro) und Bryant G1. Die quantitative Analyse der chemischen Zusammensetzung, der mit Perjodsäure oxydierten ZW erlaubt folgende Aussagen: Die N-Acetyl-galactosamin Komponente wird durch Perjodsäure nicht angegriffen. Die aus den Uronsäuren durch Carboxylreduktion hervorgegangenen Neutralzucker werden

quantitativ zu Erythrit (DSM 804) bzw. zu Erythrit und Treitol (Bryant G1) abgebaut. (Der Stamm Brynt G1 enthält Glucuronsäure und Galacturonsäure, die durch Carboxylreduktion in Glucose bzw. Galactose überführt wurden).
Diese Befunde beweisen, daß die Uronosylkomponenten beider Stämme ausschließlich C4 Substitution aufweisen, desweiteren kann eine Einfachsubstitution am C6 der N-Acetyl-galactosaminreste ausgeschlossen werden.
Die Richtigkeit der hier getroffenen Aussagen setzt voraus, daß die Kohlenhydrat-Komponenten des ZW-Polymers in der Pyranoseform vorliegen. Unter der Annahme, daß die Kohlenhydrat-Komponenten in ihrer Furanoseform vorliegen, ergäbe sich unter Berücksichtigung der beobachteten Abbauprodukte für die Uronosylkomponenten eine Substitution an C5; über die N-Acetyl-galactosaminreste könnte nur ausgesagt werden, daß eine Substitution an C4 ausgeschlossen wäre (OH-Gruppe an C4 bildet den Furanosering).
Gegen das Vorliegen der Kohlenhydratkomponenten in ihrer Furanoseform können zwei Argumente angeführt werden. Glycoside der Aldofuranosen zeigen eine starke Hydrolyselabilität (Berst et al., 1971), die bei keinem der untersuchten ZW-Polymere beobachtet wurde. Da das ^{1}H-NMR-Spektrum eines Chondrosin Standards, für den das Vorliegen der Glucuronsäure-Komponente in der Pyranoseform als gesichert gilt, mit dem ^{1}H-NMR-Spektrum der aus Zellwänden von Methanosarcina isolierten Aldobiuronsäure (GlcUA - GalN) praktisch identisch ist, kann die Pyranoseform der Glucuronsäure-Komponente des Methanosarcina-ZW-Polymers als erwiesen gelten.

Um weitere Informationen über die Lokalisation der Galactosamin-Komponenten im ZW-Polymer zu erhalten, wurden carboxylreduzierte Zellwände des Stammes DSM 804 nach Behandlung mit Perjodsäure und Reduktion mit Natriumborhydrid mittels Hydrazinolyse de-N-acetyliert. Da Aminozucker-glycoside mit freien NH_2-Gruppen sehr hydrolysestabil sind, die Glycosidbindungsstelle der, mit Perjodsäure gespaltenen und dann

reduzierten Zellwand-Komponenten dagegen sehr leicht hydrolysiert werden können, sollte dieses Verfahren die Isolierung der chemisch modifizierten "repeating unit" ermöglichen. Aus carboxylreduzierten Zellwänden des Stammes DSM 804 konnte dadurch das Oligomer:

GalN⟶GalN⟶Erythrit

in etwa 40%-iger Ausbeute (bezogen auf die eingesetzte Menge an N-Acetyl-galactosamin im ZW-Polymer) isoliert werden. Da Erythrit das Abbauprodukt der carboxylreduzierten Glucuronsäure-Komponente darstellt, handelt es sich hier um die " repeating unit " des ZW-Polymers des Stammes DSM 804. Aufgrund der dargelegten Befunde kann somit folgende Struktur des ZW-Polymers angenommen werden:

$$\left[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcUA-}(1\rightarrow 3)\text{-D-GalNAc-}(1\rightarrow 3/4?)\text{-D-GalNAc-}(1\rightarrow\right]_x$$

Noch nicht geklärt werden konnte die genaue Position der Verknüpfungsstelle zwischen den beiden N-Acetyl-galactosaminresten, sowie die Konfiguration dieser Bindung. Die Konfiguration der Glycosidbindung zur Glucuronsäure ist ebenfalls noch unklar.

3. Schlußbetrachtung

Das Strukturpolysaccharid der Zellwände von Methanosarcina barkeri weist große Ähnlichkeit mit den bei höheren Tieren vorkommenden " Mucopolysacchariden ", speziell des Chondroitins auf. Chondrosin, die de-N-acetylierte " repeating unit " des Chondroitins (Jeanloz,1970), kann aus ZW-Polymeren von Methanosarcina barkeri isoliert werden. Formal ergibt sich die " repeating unit " des ZW-Polymers von Methanosarcina durch Verlängerung des N-Acetylchondrosins um eine N-Acetyl-galactosamin Einheit. Die Methanosarcina-Zellwand

stellt neben der Halococcus-Zellwand ein weiteres Beispiel einer, aus Heteropolysacchariden aufgebauten, bakteriellen Zellwand dar. Bei Bakterien wurden Mucopolysaccharide (Hyaluronsäure) bisher nur in der Kapselsubstanz bestimmter Arten von Streptococcus nachgewiesen. Hyaluronsäure ist ein Virulenzfaktor dieser Streptokokken (Stoolmiller & Dorfman,1969; Van de Riin,1983).
In höheren Tieren sind die Mucopolysaccharide (Hyaluronsäure, Chondroitin-sulfat, Keratan-sulfat) Komponenten der extrazellulären, amorphen Grundsubstanz, die die Kollagen,- und Elastinfibrillen, sowie die Bindegewebszellen umgibt (Jeanloz,1963). Die meisten, wenn nicht alle dieser Glycosaminoglycane sind über ihr reduzierendes Ende an Protein gebunden. Die unmittelbare Bindungsregion zum Protein bilden kurze Neutralzuckerbrücken, Bei Chondromucoproteinen, Heparin und Heparan-monosulfat, werden folgende Strukturen beobachtet (Stoolmiller & Dorfman,1969).

$(GlcUA\text{-}GalNAc)_x$ -GlcUA-Gal-Gal-Xyl-O-Seryl-Protein

Im Proteinanteil Chondroitin-4-sulfat und 6-sulfat enthaltender Bindegewebsarten sind 4 Aminosäuren dominierend: Serin, Glutaminsäure, Prolin und Glycin. Diese 4 Aminosäuren bilden auch den Hauptanteil der, an das Chondroitin gebundenen Restproteine (etwa 3 Gewichtsprozent) nach proteolytischer Verdauung des Bindegewebes. Die Paare Serin und Glycin, sowie Glutaminsäure und Prolin treten hierbei in äquimolaren Mengen auf.(Anderson et al.,1965)
Die nach tryptischer Verdauung isolierter Zellwandsacculi aus 8 Stämmen von Methanosarcina barkeri enthalten relativ geringe Mengen an Glucose (unter 5%, s.Tab.II), sowie Restproteine (0.7 bis 2.6%). Glycin, Serin und Glutaminsäure konnten in ZW-Hydrolysaten aller untersuchten Stämme nachgewiesen werden; Prolin wurde bei 7 Stämmen nachgewiesen. Bei einem der Stämme scheint Prolin zu fehlen (s.Tab.I). Die

Molverhältnisse der genannten Aminosäuren variieren je nach Stamm erheblich. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, daß in proteolytisch unbehandelten Zellwänden von Methanosarcina barkeri Heteropolysaccharide mit Proteinen verknüpft sind. Eine O-glycosidische Bindung scheint nicht vorzuliegen, da die Restproteine (untersucht wurden hier Stamm DSM 804 und Bryant G1) durch Alkalibehandlung nicht entfernt werden konnten. (Durch Alkalibehandlung werden O-Seryl-glycoside β-eliminativ gespalten).
Eine endgültige Klärung dieses Aspekts der ZW-Zusammensetzung von Methanosarcina barkeri sollten weitere Untersuchungen erbringen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Aus allen untersuchten Stämmen von Methanosarcina barkeri konnten Zellwandsacculi isoliert werden, die die Form der intakten Zellen besitzen. Die chemische Zusammensetzung dieser Zellwandsacculi ist durchgehend sehr einheitlich. Sie bestehen im wesentlichen aus N-Acetyl-galactosamin und Uronsäuren im Molverhältnis 2 : 1. Eine Ausnahme bildet der Stamm DSM 2053 (M.mazei) mit einem Molverhältnis von 3 : 1. Desweiteren sind geringe Mengen an Glucose, sowie Spuren an Mannose nachweisbar.
Die genannten Kohlenhydrat-Komponenten der Methanosarcina-Zellwand entstammen alle der D Reihe.
Modifikationen betreffen die Art der Uronsäuren. Im ZW-Polymer von zwei Stämmen wird Glucuronsäure teilweise durch Galacturonsäure ersetzt. Der Phosphat und Sulfat Gehalt der Methanosarcina Zellwand ist vernachlässigbar.
Für eine Beteiligung von Murein oder Pseudomurein am Aufbau der Zellwandsacculi ergaben sich keinerlei Hinweise.
Das Baumaterial der Methanosarcina Zellwand ist somit als saures Heteropolysaccharid zu bezeichnen.
Durch Behandlung mit 10% Natrium Borhydrid (12 h bei 60°) und anschließender Dialyse wurden wasserlösliche Zellwandfraktionen (Molekulargewicht ≥ 10 000 Dalton) erhalten.
Die chemische Zusammensetzung dieser Präparationen entspricht im wesentlichen der chem. Zusammensetzung der unlöslichen Zellwandsacculi.
Die isolierten Zellwandsacculi bzw. deren wasserlösliche Formen, werden durch Chondroitinasen und Hyaluronidase nicht angegriffen.

Die Uronosylkomponenten konnten im unhydrolysierten ZW-Polymer, nach Aktivierung durch Carbodiimid, mit $NaBH_4$ zu den entsprechenden Neutralzuckern reduziert werden. (Die Reduktionsrate betrug etwa 80%, der im ZW-Polymer enthaltenen Uronsäuren).

Sowohl unbehandelte, als auch carboxylreduzierte Zellwände werden durch Perjodsäure oxydiert. Die qualitative und quantitative Analyse der, mit $NaBH_4$ reduzierten Oxydationsprodukte (Smith-Abbau) ergab die für C4 substituierte Glucuronsäuren bzw. die für C4 substituierte Glucose (Galactose) zu erwartenden Bruchstücke Erythronsäure bzw. Erythrit (Threitol). Die N-acetyliert vorliegende Galactosamin-Komponente des ZW-Polymers wird durch Perjodsäure nicht angegriffen.
Aus Parialhydrolysaten ausschließlich Glucuronsäure enthaltender Zellwände wurden in etwa 30%-iger Ausbeute (bezogen auf den Uronsäuregehalt des ZW-Polymers) Disaccharide, bestehend aus Glucuronsäure und Galactosamin isoliert. Die vollständige Analyse ergab folgende Struktur:

β-D-GlcUA-(1⟶3)-D-GalN

Diese Verbindung ist mit Chondrosin (2-Amino-2-deoxy-3-O-β-D-Glucopyranosyluronsäure-D-Galactose) der de-N-acetylierten "repeating unit" des Chondroitins identisch.

Nach Smith-Abbau carboxylreduzierter Zellwände, Hydrazinolyse und anschließender saurer Hydrolyse konnte die chemisch modifizierte "repeating unit" des ZW-Polymers von Methanosarcina isoliert werden.

(GalN-GalN-Erythrit)

Auf Grund dieser Ergebnisse erfolgte ein Strukturvorschlag.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Anderson,B., Hoffman,Ph., and Meyer,K.,: The O-serine linkage in peptides of chondroitin 4- or 6-sulfate. J. Biol. Chem. 240, 156 (1965).

Avigad,G., Amaral,D., Asensio,C., and Horecker, B.L., : The D-galactose oxidase of Polyporus circinatus. J. Biol. Chem. 237, 2736 (1962).

Baddiley,J., and Davison,A.C., : The occurence and location of teichoic acids in lactobacilli. J. gen. Microbiol. 24, 295 (1961).

Balch,W.E., Magrum,L.J., Fox,G.E., Woese,C.R., and Wolfe,R.S., : Methanogens : reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43, 260 (1979).

Bergmeyer,H.U., : Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim (1974).

Berst,M., Lüderitz,O., and Westphal,O., : Studies on the structure of T1 lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 18, 361 (1971).

Blumenkrantz,N., and Asboe-Hansen,G., : A new method for quantitative determination of uronic acids. Analyt. Biochem. 54, 484 (1973).

Boas,N.F., : A method for the determination of hexosamins in tissues. J. Biol. Chem. 204, 553 (1953).

Bochem,H.P., Schoberth,S.M., and Wengler,P., : Thermophilic biomethanation of acetic acid : morphology and ultrastructure of a granular consortium. Can. J. Microbiol. 28, 500 (1982).

Chen,P.S., Toribara,T.Y., and Warner,H., : Microdetermination of phosphorus. Analyt. Biochem. 28, 1756 (1956).

Cifonelli, J.A., and Dorfman, A.,: Properties of heparin monosulfates (Heparitin monosulfat). J. Biol. Chem. 235, 3283 (1960).

Clotten, R., und Clotten, A.,: Hochspannungselektrophorese, Thieme-Verlag, Stuttgart (1962).

Dimitriev, B.A., Knirel, YU.A., and Kochetkov, N.K.,: Selective cleavage of glycosidic linkages (Studies with the model compound benzyl-2-acetamido-2-deoxy--3-O-β-D-galactopyranosyl-α-D-glucopyranoside) Carbohydr. Res. 29, 451 (1973).

Ferry, J.G., Smith, P.H., Wolfe, R.S.,: Methanospirillum, a new genus of methanogenic bacteria, and charakterization of Methanospirillum hungatii sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 465 (1974).

Fromme, I., und Beilharz, H.,: Gas chromatographic assay of total and O-acetyl groups in bacterial lipopolysaccharides. Analyt. Biochem. 84, 347 (1978).

Fox, G.E., Magrum, L.I., Balch, W.E., Wolfe, R.S., and Woese, C.R.,: Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 4537. (1977).

Galambos, J.T.,: The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. Analyt. Biochem. 19, 119 (1967).

Grado, C., and Ballou, C.E.,: Myo-inositol phosphates obtained by alkaline hydrolysis of beef brain phosphoinositide. J. Biol. Chem. 236, 54 (1961).

Hammes, W.P., Winter, J., and Kandler, O.,: The sensitivity of the pseudomurein containing genus Methanobacterium to inhibitors of murein synthesis. Arch. Microbiol. 123, 275 (1979).

Hestrin, S.,: The reaction of acetylcholin and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. J. Biol. Chem. 180, 249 (1949).

Inoue, Y., and Nagasawa, K.,: On the reaction of N-acetylchondrosine, N-acetylchondrosine 6-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and heparin with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide. Carbohydr. Res. 111, 113 (1982).

Jeanloz, R.W.,: Mucopolysaccharides (acidic glycosaminoglycans) In: Comprehensive Biochemistry Vol. 5, 263 (1963).

Jeanloz, R.W.,: Mucopolysaccharides of higher animals. In: The Carbohydrates, Vol. II B, 589 Ed. by W. Pigman, D. Horton. New York-London Academic Press (1970).

Jeffrey, P.C., and Rienits, K.E.,: An improved method for the isolation of hexuronic acids from chondroitin sulfate preparations. Biochem. Biophys. Acta 141, 179 (1967).

Jensen, M.,: Dissertation Freiburg i. Br. (1980).

Johnson, A.R.,: Improved method of hexosamine determination. Analyt. Biochem. 44, 628 (1971).

Jones, T.M., and Albersheim, P.,: A gaschromatographic method for the determination ov aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. Plant. Physiol. 49, 926 (1972).

Kandler, O., and Hippe, H.,: Lack of peptidoglycan in the cell walls of Methanosarcina barkeri. Arch. Microbiol. 113, 57 (1977).

Kandler, O.,: Zellwandstrukturen bei Methan-Bakterien. Zur Evolution der Prokaryonten. Naturwissenschaften 66, 95 (1979).

Kandler, O.,: Archaebakterien und Phylogenie der Organismen. Naturwissenschaften 68, 183 (1981).

Kandler, O.,: Cell wall structures and their phylogenetic implications. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 149 (1982).

Kandler, O., and König, H.,: Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of methanogenic bacteria. Arch. Microbiol. 118, 141 (1978).

Kidby, D.K., and Davidson, D.J.,: A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. Analyt. Biochem. 55, 321 (1973).

König, H.,: Dissertation München (1979).

König, H., and Kandler, O.,: N-Acetyltalosaminuronic acid a constituent of the pseudomurein of the genus Methanobacterium. Arch. Microbiol. 123, 295 (1979a).

König, H., and Kandler, O.,: The amino acid sequence of the peptide moiety of the pseudomurein from Methanobacterium thermoautotrophicum. Arch. Microbiol. 121, 271 (1979b).

König, H., Kralik, R., and Kandler, O.,: Structure and modifications of pseudomurein in Methanobacteriales. Zb. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 179 (1982).

Lehnhardt, W.F., and Winzler, R.J.,: Determination of neutral sugars in glycoproteins by gas-liquid chromatography. J. Chromatog. 34, 471 (1968).

Mayer, H., Framberg, K., and Weckesser, J.,: 6-O-Methyl-D-glucosamine in lipopolysaccharides of Rhodopseudomonas palustris strains. Eur. J. Biochem. 44, 181 (1974).

Partridge, S.M.,: Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature 164, 443 (1949).

Perry, M.B., and Hulyalkar, R.K.,: The analysis of hexuronic acids in biological materials by gas liquid partition chromatography. Can. J. of Biochem. 43, 573 (1965).

Porter, W.H.,: Application of nitrous acid deamination of hexosamines to the simultaneous GLC determination of neutral and amino sugars in glycoproteins. Analyt. Biochem. 63, 27 (1975).

Rydan, H.N., and Smith, P.W.G.,: A new method for the detection of peptides and similar compounds on paper chromatograms. Nature, 169, 922 (1952).

Reissig, J.C., Strominger, J.C., and Leloir, C.F.,: A modified colorimetric method for the extimation of N-acetylaminosugars. J. Biochem. 217, 959 (1955).

Schleifer, K.H., und Kandler, O.,: Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von Streptococcus thermophilus und Streptococcus faecalis. Arch. Microbiol. 57, 335 (1967).

Scott, J.W., and Tigwell, M.J.,: Periodate oxidation and the shapes of glycosaminoglycuronans in solution. Biochem. J. 173, 103 (1978).

Smith, R.L., and Gilkerson, E.,: Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydraton hydrochloride. Analyt. Biochem. 98, 478 (1979).

Spiro, R.G.,: Charakterization of carbohydrate units of glycoproteins. In: Methods in Enzymology, Vol. VIII, 26. Ed. by E.F. Neufeld, V. Ginsburg. New York London, Academic Press (1966).

Steber, J.,: Dissertation München (1976).

Steber, J., and Schleifer, K.H.,: Halococcus morrhuae: A sulfated heteropolysaccharide as the structural component of the bacterial cell wall. Arch. Microbiol. 105, 173 (1975).

Steber, J., and Schleifer, K.H.,: N-Glycyl-glucosamin: A novel constituent in the cell wall of Halococcus morrhuae. Arch. Microbiol. 123, 209 (1979).

Stoolmiller, A.C., and Dorfman, A.,: The biosynthesis of hyaluronic acid by streptococcus. J. Biol. Chem. 244, 236 (1969).

Stoolmiller, A.C., and Dorfman, A.,: The metabolism of glycosaminoglycans. In: Comprehensive Biochemistry Vol. 17, 241 (1969).

Taylor, R.C., and Conrad, H.E.,: Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimid activated carboxyl groups. Biochem. 11, 1383 (1972).

Trevelya, W.E., and Procter, D.D., Harrison, J.S.,: Detection of sugars on paperchromatograms. Nature 166, 444 (1950).

Tsuij, A., Kinoshita, T., and Hoshino, M.,: Analytical chemical studies on aminosugars. II. Determination of hexosamins using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Chem. Pharm. Bull. 17, 1505 (1969a).

Tsuij, A., Kinoshita, T., and Hoshino, M.,: Microdetermination of hexosamines. Chem. Pharm. Bull. 17, 217 (1969b).

Van de Rijn, I.,: Streptococcal hyaluronic acid: proposed mechanism of degradation and loss of synthesis stationary phase. J. Bacteriol. 156, 1059 (1983).

Vliegenthart, J.F.G., van Halbeck, H., and Dorland, L.,: The applicability of 500 MHz high-resolution ^{1}H-NMR--spectroscopy for the structure determination of carbohydrates derived from glycoproteins. Pure Appl. Chem. 53, 45 (1981).

Welti, D., Rees, D., and Welsh, J.,: Solution conformation of glycosaminoglycans: Assignment of the 300 MHz ^{1}H-magnetic-resonance spectra of chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate and hyaluronate and investigation of an alkali induced conformation change. Eur. J. Biochem. 94, 505 (1979).

Woese, C.R., and Fox, G.E.,: Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Acad. Sci. 74, 5088 (1977).

Woese, C.R., Magrum, C.J., and Fox, G.E.,: Archaebacteria. J. Mol. Evol. 11, 245 (1978).

Wohl, A., und Schellenberg, R.,: Ber. 55, 1406 (1922).

Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., and Suzuki, S.,: Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J. Biol. Chem. 243, 1523 (1968).

Yamaguchi, H., and Mukumoto, T.,: GLC analysis of the hydroxy and oxo compounds produced by the Smith-Degradation of reducing di- and trisaccharides. J. Biochem. 82, 1673 (1977).

Zeikus, J.G.,: The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 514 (1977).

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Ludwigs-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. O. Kandler von November 1979 bis Feoruar 1984 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für großzügige Unterstützung, für hilfreiche Diskussionen und wertvolle Ratschläge sowie für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Für die tatkräftige Anleitung bei der Anzucht der Mikroorganismen bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. J. Winter.

Bei Herrn Dr. Helmut König möchte ich mich für viele nützliche Diskussionen sowie für die Aufnahme der NMR-Spektren recht herzlich bedanken.

Herrn Dr. N. Weiß danke ich für seine wertvollen Hinweise bezüglich der Gaschromatographie.

Bei Frl. C. Stöckel bedanke ich mich für die Bilder der Dünnschnitte von Methanosarcina Zellwänden.

Schließlich möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern am Botanischen Institut meinen besonderen Dank für das freundliche Arbeitsklima ausdrücken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Peter Kreisl, geb. am 25 Februar 1951 in Nellueck/Oberpfalz; verheiratet seit Februar 1979, ein Sohn.

Schulbildung:

1957 - 1963 Volksschule in Roding/Obpf.
1963 - 1967 Staatl. Realschule Roding
1967 Mittlere Reife
1967 - 1971 Joseph v. Fraunhofer Gymnasium in Cham/Obpf.
1971 Abitur

Studium:

1971 - 1972 Universität München
Studienfächer: Physik/Chemie für das Lehramt
1972 Wechsel des Studienziels in Chemie-Diplom
1977 Diplomhauptprüfung

Diplomarbeit:

Nov. 1977 bis Okt. 1978 am Botanischen Institut der Universität München bei Prof. Dr. W. Rüdiger unter offizieller Leitung von Prof. Dr. G. Hartmann, Chemisches Institut (Abt. Biochemie) der Universität.

Promotion:

Nov. 1979 Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik der Universität München unter Leitung von Prof. Dr. O. Kandler.